

# Rapporti ISTISAN

12/9



**Nuove sostanze neurotossiche  
prodotte da alghe:  
la  $\beta$ -N-metilammino-L-alanina**



ISSN 1123-3117

M. Bruno, D. Mizzoni



**ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ**

**Nuove sostanze neurotossiche prodotte da alghe:  
la  $\beta$ -N-metilammmino-L-alanina**

Milena Bruno, Davide Mizzoni

*Dipartimento Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria,  
Istituto Superiore di Sanità, Roma*

ISSN 1123-3117

**Rapporti ISTISAN**

**12/9**

Istituto Superiore di Sanità

**Nuove sostanze neurotossiche prodotte da alghe: la  $\beta$ -N-metilammino-L-alanina.**

Milena Bruno, Davide Mizzoni

2012, 39 p. Rapporti ISTISAN 12/9

I cianobatteri producono un'ampia gamma di metaboliti secondari (cianotossine) associati ad effetti negativi sulla salute degli animali e degli uomini. La maggior parte dei cianobatteri produce  $\beta$ -N-metilammino-L-alanina (BMAA), aminoacido non proteico neurotossico, originariamente scoperto nei frutti delle cicadine e biomagnificato nella catena alimentare. La BMAA è stata indicata come possibile agente causale della sclerosi laterale amiotrofica/complesso parkinsonismo-demenza (SLA/PDC) che ha tassi di incidenza estremamente alti, paragonati con il resto del mondo, nella popolazione Chamorro di Guam (Oceano Pacifico occidentale). La BMAA è stata anche rilevata in cervelli di pazienti canadesi e statunitensi con malattia di Alzheimer, dimostrando di non essere circoscritta a Guam. Recenti ricerche hanno focalizzato i possibili effetti cronici di basse dosi di BMAA. I meccanismi di assunzione della BMAA includono consumo di pesce contaminato, ingestione di acqua lacustre (o possibili infiltrazioni di acqua contaminata nei pozzi artesiani) e attività ricreative in aree con fioriture di cianobatteri.

*Parole chiave:* Cianotossine;  $\beta$ -N-metilammino-L-alanina; Rilevazione; Effetti tossici

Istituto Superiore di Sanità

**New neurotoxic substances produced by blue-green algae: the  $\beta$ -N-methylamino-L-alanine.**

Milena Bruno, Davide Mizzoni

2012, 39 p. Rapporti ISTISAN 12/9 (in Italian)

Cyanobacteria produce a wide array of secondary metabolites (cyanotoxins) that are associated with adverse health effects in animals and humans. Most cyanobacteria produce  $\beta$ -N-methylamino-L-alanine (BMAA), a neurotoxic non-protein amino acid, originally discovered in cycad seeds and biomagnified along the food chain. BMAA has been suggested as a possible causative agent of the amyotrophic lateral sclerosis/parkinsonism-dementia complex (ALS/PDC) that has an extremely high rate of incidence among the Chamorro people of Guam (in the Western Pacific Ocean) compared with incidence rates of ALS elsewhere. BMAA has also been detected in the brains of Canadian and US patients with Alzheimer's disease, suggesting not to be unique to Guam. Recent research has focused on possible chronic effects of BMAA at low doses over time. Mechanisms of BMAA acquisition include consuming contaminated fish, ingestion of lake water (or possibly infiltration of contaminated lake water into artesian wells) and recreation in areas with cyanobacteria blooms.

*Key words:* Cyanotoxins;  $\beta$ -N-methylamino-L-alanine; Detection; Toxic effects

Per informazioni su questo documento scrivere a: [mbruno@iss.it](mailto:mbruno@iss.it).

Il rapporto è accessibile online dal sito di questo Istituto: [www.iss.it](http://www.iss.it).

Citare questo documento come segue:

Bruno M, Mizzoni D. *Nuove sostanze neurotossiche prodotte da alghe: la  $\beta$ -N-metilammino-L-alanina*. Roma: Istituto Superiore di Sanità, 2012. (Rapporti ISTISAN 12/9).

---

Presidente dell'Istituto Superiore di Sanità e Direttore responsabile: *Enrico Garaci*  
Registro della Stampa - Tribunale di Roma n. 131/88 del 1° marzo 1988

Redazione: *Paola De Castro, Sara Modigliani e Sandra Salinetti*  
La responsabilità dei dati scientifici e tecnici è dei singoli autori.



# INDICE

<b>Cianobatteri e cianotossine</b> .....	1
La $\beta$ -N-metilammino-L-alanina.....	1
<b>Possibile legame BMAA – SLA/PDC</b> .....	5
Il Complesso Sclerosi Laterale Amiotrofica/Parkinsonismo-Demenza (SLA/PDC).....	5
Storia di Guam.....	6
L'ipotesi del legame causale.....	6
La SLA/PDC e la dieta tradizionale Chamorro.....	7
La biomagnificazione della BMAA nell'ecosistema di Guam.....	7
<b>Produzione nei cianobatteri e bioaccumulo</b> .....	9
Significato ecologico.....	9
Significato evolutivo.....	10
Produzione mista ad altre cianotossine nei corpi idrici britannici.....	11
Il cianobatterio <i>Nostoc commune</i> , utilizzato come alimento negli altopiani peruviani dalle popolazioni indigene.....	12
I cianobatteri sudafricani.....	12
Le catene alimentari acquatiche della Florida del Sud.....	13
L'ecosistema acquatico temperato: il Mar Baltico.....	14
Cianobatteri e zooplancton.....	14
Vertebrati e invertebrati.....	14
<b>Localizzazione della BMAA nel tessuto cerebrale</b> .....	17
Tecniche utilizzate per rilevare la presenza di BMAA nel cervello umano colpito da SLA/PDC.....	17
Distinzione della BMAA dal suo isomero strutturale 2,4-DAB.....	17
BMAA libera e associata alle proteine.....	19
BMAA nel tessuto cerebrale.....	19
<b>Meccanismi molecolari della BMAA</b> .....	21
Legame tra BMAA e neurotossicità / neurodegenerazione <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> .....	21
Latenza degli effetti.....	24
Metabolismo ed effetti metabolici in sistemi modello, in tessuti neurali, in altri tessuti murini <i>in vitro</i> .....	24
Metodo sperimentale e metabolismo della BMAA.....	24
Chimica-fisica.....	24
Effetti su taurina, serina e glicina cerebrali.....	25
Effetti su ammonio e alanina cerebrali.....	25
Effetti della BMAA sulla glutammina.....	26
Metilammina: un prodotto del metabolismo della BMAA.....	26
Aumento della neurotossicità attraverso “meccanismi multipli”.....	27
Sinergia tossica a basse concentrazioni.....	27
Azione sul recettore NMDA.....	28
Triplice meccanismo di neurotossicità: attivazione di NMDA e di mGluR5, induzione di stress ossidativo.....	29
Esposizione a BMAA durante lo sviluppo: effetti a breve e a lungo termine.....	30
Somministrazione neonatale di BMAA ai Roditori: captazione selettiva ed effetti comportamentali.....	30
Esposizione a BMAA nel periodo neonatale in ratti adulti: danni cognitivi a lungo termine.....	31
<b>Considerazioni conclusive</b> .....	33
<b>Bibliografia</b> .....	37



## CIANOBATTERI E CIANOTOSSINE

I Cianobatteri, comparsi per la prima volta sulla Terra 3 miliardi di anni fa, sono tra i più antichi gruppi di organismi viventi. Essi sono responsabili della prima produzione fotosintetica di ossigeno atmosferico e di circa il 50% di tutte le N<sub>2</sub>-fissazioni (azoto fissazioni) negli ecosistemi marini. Hanno una distribuzione cosmopolita, possono trovarsi in luoghi diversi di tutto il mondo: in acque dolci, salmastre e marine, su rocce e terreni; sono colonizzatori primari, possono vivere in ambienti estremi ed esistere come organismi a vita libera o simbiotica. Vengono chiamati anche “alghe verdi-azzurre” e sono una parte importante dell’aumento massiccio delle fioriture algali in tutte le acque, favorito dall’innalzamento dell’eutrofizzazione degli ambienti acquatici e dal riscaldamento globale.

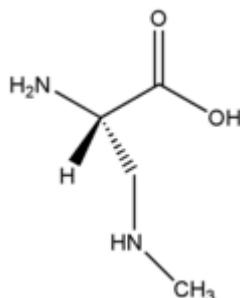
Le fioriture di cianobatteri rappresentano un nuovo rischio per la salute attraverso l’acqua ad uso potabile e ricreativo, a causa della produzione di potenti tossine (cianotossine) (Metcalf, 2008). Le cianotossine, a grandi linee divisibili in molecole a bersaglio neurotossico o epatotossico, in quest’ultimo gruppo sono note presentare anche subdole azioni croniche, con rischio cancerogenico (Shaw, 2000; Shen, 2002; IARC, 2008).

Le intossicazioni umane da avvelenamenti a causa di fioriture cianobatteriche hanno raggiunto livelli catastrofici: ad esempio, in Brasile 50 pazienti sottoposti a dialisi sono morti in seguito all’esposizione ad acqua inadeguatamente trattata, contaminata da microcistine, dal serbatoio idrico di Tabocas, mentre in Australia si ebbe il ricovero di 150 persone (140 bambini e 10 adulti) che bevvero acqua contaminata da cianobatteri intrappolati dalla diga di Solomon (Cox, 2005; Banack, 2007).

Le tossine cianobatteriche sono state anche implicate in morti di fauna selvatica nel settore della pesca e dei mammiferi terrestri, e si accumulano nelle catene alimentari degli ecosistemi. Molte ricerche sono state effettuate sulle cianotossine riguardo alle modalità di azione, ai destini ambientali, alla loro individuazione e quantificazione e alla rimozione o distruzione nei processi di trattamento delle acque. Negli ultimi anni sono state evidenziate nuove classi di tossine, le cui produzioni accompagnano collateralmente quelle delle tossine più note e nocive nel metabolismo delle cellule cianobatteriche.

### La $\beta$ -N-metilammino-L-alanina

La neurotossina  $\beta$ -N-metilammino-L-alanina (BMAA), conosciuta anche come acido  $\alpha$ -ammino- $\beta$ -metilamminopropionico (MeDAP) e acido S(+)-*m*-metil- $\alpha,\beta$ -diaminopropionico (Vega e Bell, 1967) (Figura 1), è un aminoacido neurotossico non-proteico prodotto pressoché da tutti i gruppi conosciuti di cianobatteri (Cox, 2005) nei più diversi ambienti ed ecosistemi di tutto il mondo.



**Figura 1. Struttura della  $\beta$ -N-metilammino-L-alanina**

La diffusione così ampia di questa neurotossina, unita alla sua elevata tossicità sta attirando, soprattutto negli ultimi anni, una grandissima attenzione da parte della comunità scientifica internazionale allo scopo di valutare la sua effettiva pericolosità per la salute umana e quindi i rischi connessi, il suo meccanismo d'azione neurotossico, il suo grado di diffusione nell'ambiente terrestre e acquatico (marino e d'acqua dolce) e le sue fonti di esposizione per la popolazione umana (catene alimentari acquatiche e terrestri, rifornimenti idrici per l'acqua potabile o per le attività ricreative acquatiche).

Queste preoccupazioni sono supportate da dati di laboratorio (esperimenti *in vitro* e *in vivo*) che indicano un'elevata neurotossicità della BMAA e un suo molto probabile coinvolgimento nelle malattie umane neurodegenerative progressive (Sclerosi Laterale Amiotrofica, Morbo di Alzheimer, Morbo di Parkinson), come possibile agente eziologico o come agente neurotossico che potenzia altri insulti neuronali (determinati cioè da altri agenti o fattori neurotossici) grazie alla sua capacità di legarsi alle proteine funzionando come un serbatoio neurotossico endogeno per il futuro rilascio della neurotossina nelle cellule. Questa si accumulerebbe, sarebbe trasportata tra i livelli trofici e successivamente rilasciata lentamente durante il metabolismo delle proteine, causando così danni neurologici primari ricorrenti per diversi anni.

La BMAA, inizialmente chiamata acido  $\beta$ -N-metil- $\beta$ - $\alpha$ -diaminopropanoico (MeDAP), è stata originariamente scoperta nei semi di *Cycas myconesica* (Cicadee) una gimnosperma utilizzata dalla popolazione indigena Chamorro di Guam nell'Oceano Pacifico occidentale per la produzione di farina utilizzata in *tortillas*, gnocchi e minestre. La BMAA è stata indicata come possibile agente eziologico del Complesso Sclerosi Laterale Amiotrofica/Parkinsonismo-Demenza (SLA/PDC), detto anche demenza di Guam, che è un disturbo neurologico progressivo che presenta sintomi simili alla Sclerosi Laterale Amiotrofica (SLA), al Morbo di Parkinson (PD) e al Morbo di Alzheimer (AD): si ha un progressivo disturbo demenziale (simile all'AD) con il coinvolgimento motorio di tipo extrapiramidale (parkinsoniano) o si ha una progressiva sindrome del motoneurone simile alla SLA (Ince e Codd, 2005; Papapetropoulos, 2007). Meno frequentemente entrambi i fenotipi coincidono. La SLA/PDC ha un altissimo tasso di incidenza tra il popolo Chamorro dell'isola di Guam (nell'Oceano Pacifico occidentale) rispetto ai tassi di incidenza della SLA in altre parti (superiore da 50 a 100 volte a quella degli Stati Uniti nel 1950), caratterizzata da un'età media molto più giovane rispetto alle popolazioni degli Stati Uniti (55 anni contro 70 anni). Recenti indagini suggeriscono che l'incidenza e la prevalenza si sono considerevolmente ridotte nel corso degli ultimi 4 decenni (a livelli di 7/100.000) rispetto ai tassi di incidenza descritti nel resto del mondo. Sembra anche che la malattia si sia evoluta nel tempo presentandosi prevalentemente in modo clinico come parkinsonismo e demenza, piuttosto che come SLA, suggerendo una causa ambientale e non

genetica (Banack, 2010a). Poiché i primi sospetti di una base genetica nell'origine della SLA/PDC non sono stati supportati dagli studi più dettagliati, le principali ipotesi iniziali associate al complesso della SLA/PDC di Guam sono state ambientali: studi epidemiologici hanno indicato per molto tempo nel consumo di una dieta tradizionale dei Chamorro la causa della SLA/PDC a Guam.

In particolare, la scoperta di BMAA nei semi delle Cicadee, un alimento principale utilizzato dagli indigeni Chamorro di Guam per la produzione di una farina impiegata in *tortillas*, gnocchi e minestre, ha fatto ipotizzare che la BMAA pervenuta ai Chamorro attraverso il consumo di farina di cicadee potesse causare la SLA/PDC. La somministrazione di BMAA alle scimmie macaco ha portato a deficit neurologici, ma gli effetti erano acuti e non portavano alla neurodegenerazione progressiva.

L'ipotesi della BMAA come presunta causa della SLA/PDC attraverso il consumo di semi di cicadee è stata inizialmente contestata da Duncan *et al.* (1990), poiché la presenza di una bassa concentrazione di tossine cicadee (come la BMAA) nella farina di *Cycas* lavata, era ritenuta insufficiente per provocare una malattia neurodegenerativa nell'uomo. Questa ipotesi è stata rivalutata quando si è scoperto che la BMAA è biomagnificata all'interno dell'ecosistema di Guam, e si trova nei tessuti cerebrali dei Chamorro che sono morti di SLA/PDC (media di 627 µg/g della BMAA), ma non nei pazienti Chamorro deceduti per cause non correlate a malattie neurodegenerative.

Queste scoperte hanno fornito la prima dimostrazione di un possibile legame tra la neurotossina β-N-metilammino-L-alanina (BMAA) e le malattie neurodegenerative progressive come la SLA/PDC di Guam, suggerendo una possibile biomagnificazione della BMAA anche al di fuori di Guam. Cox *et al.* (2003) hanno riportato la magnificazione della BMAA nell'ecosistema di Guam lungo la catena alimentare, in un triangolo di concentrazioni crescenti di sostanze tossiche in cui i livelli aumentano notevolmente lungo la catena alimentare (circa 100 volte per ogni livello trofico), raggiungendo valori molto elevati nelle volpi volanti (10.000 volte superiori a quelli di colture di *Nostoc axeniche*).

Questo fornisce prove a sostegno dell'ipotesi della BMAA come agente eziologico della SLA/PDC di Guam, spiegando perché l'incidenza della SLA/PDC tra i Chamorro è 50-100 volte l'incidenza di SLA altrove: il consumo di volpi volanti (pipistrelli della frutta di grandi dimensioni, considerate una prelibatezza tradizionale dai Chamorro che le lessano in crema di cocco e le mangiano intere), pasturanti sui frutti di *Cycas*, potrebbe causare l'esposizione a livelli elevati di BMAA con eventuale sviluppo di malattie (Cox e Sacks, 2002). Inoltre la BMAA viene sintetizzata dai cianobatteri simbiotici *Nostoc* azoto-fissatori, che vivono nelle radici coralloidi delle piante *Cycas* piuttosto che nelle piante stesse.

Oltre che nei tessuti cerebrali di Chamorro che sono morti di SLA/PDC (con una media di 627 µg/g di BMAA), ma non nei pazienti Chamorro deceduti per cause non correlate a malattie neurodegenerative, la BMAA è stata scoperta (in due studi successivi) anche nei tessuti cerebrali di 9 Canadesi malati di Alzheimer (concentrazione media di BMAA 107 µg/g), ma non è stata rilevata nel tessuto cerebrale di altri 14 canadesi che sono morti per cause non collegate alla neurodegenerazione.

Questi risultati sono stati recentemente confermati in uno studio condotto da Pablo *et al.* (2009), che ha trovato la BMAA nel tessuto cerebrale di canadesi affetti da morbo di Parkinson (concentrazione media di 214 µg/g della BMAA), nel cervello di pazienti statunitensi affetti da SLA (concentrazione media della BMAA 268 µg/g), ma non in quello dei pazienti con malattia di Huntington, o in controlli, suggerendo che la BMAA non si trova come un sottoprodotto della neurodegenerazione.

Studi successivi hanno mostrato che la BMAA si trova negli organismi in 2 forme: BMAA libera e BMAA legata alle proteine di tessuti animali e vegetali (Murch, 2004a). I primi studi

che avevano ottenuto una bassa quantità di BMAA presente nella farina di Cycas, avevano misurato solo la quantità di BMAA libera senza misurare la frazione legata alle proteine dei Chamorro.

Al contrario dei risultati precedenti, Montine *et al.* (2005) non hanno trovato la BMAA libera nel complesso SLA/ PDC o nei tessuti di controllo: questo è stato spiegato col metodo utilizzato, non convalidato e poco sensibile e soprattutto col fatto che Montine *et al.* non avevano verificato i loro risultati con una seconda tecnica analitica.

La scoperta della presenza di BMAA nei tessuti cerebrali di persone canadesi affette da Alzheimer ha evidenziato che la tossina non fosse prodotta solo dai cianobatteri simbiotici *Nostoc* azoto-fissatori che vivono nelle radici coralloidi delle piante cycadee, ma potesse trovarsi anche in altri ambienti: nel 2003 Cox *et al.* hanno trovato altre simbiosi tra cianobatteri e piante (*Azolla filiculoides*, 2 µg/g, simbiosi con *Anabaena azollae*; e *Gunnera kauaiensis*, 4 µg/g, simbiosi con *Nostoc punctiforme*); nel 2005 lo stesso gruppo ha trovato che pressoché tutti i cianobatteri sono in grado di produrre BMAA (in oltre il 95% dei generi di cianobatteri a vita libera analizzati, in tutti i membri delle 5 principali sezioni cianobatteriche e nel 97% dei ceppi analizzati). Questa scoperta è stata confermata in seguito da altri esperimenti in ambienti estremamente diversi indicando che, date le giuste condizioni (fase di crescita e/o fasi del ciclo della vita), tutti i cianobatteri sono in grado di produrre BMAA e, a causa della loro ubiquità (nei diversi ambienti terrestri e acquatici), la BMAA può essere prodotta nei più diversi ambienti ed ecosistemi di tutto il mondo, ampliando in maniera esponenziale le potenzialità della sua distribuzione e la sua quantità totale rilasciata dall'ambiente.

## POSSIBILE LEGAME BMAA-SLA/PDC

### Il Complesso Sclerosi Laterale Amiotrofica/Parkinsonismo-Demenza (SLA/PDC)

Il Complesso Sclerosi Laterale Amiotrofica/Parkinsonismo-Demenza (SLA/PDC) è un complesso di malattie neurodegenerative che presenta sintomi simili alla SLA, al morbo di Parkinson (PD) e al morbo di Alzheimer (AD). La SLA/PDC

ha un altissimo tasso di incidenza tra il popolo Chamorro dell'isola di Guam nell'Oceano Pacifico occidentale rispetto ai tassi di incidenza della SLA in altre parti (superiore da 50 a 100 volte a quella degli Stati Uniti nel 1950) e caratterizzato a Guam da un'età media di insorgenza molto più giovane rispetto alle popolazioni degli Stati Uniti (55 anni contro 70 anni). Infatti, tra la fine del 1940 e l'inizio del 1950 a Guam è stata registrata un'incidenza eccezionalmente alta di SLA con esordio ritardato, con caratteristiche extrapiramidali e demenza (SLA/PDC).

Oltre a Guam, sono stati descritti altri due focolai dove la SLA/PDC è presente con un'alta incidenza: in alcuni villaggi sull'isola di Honshu (penisola di Kii) del Giappone e nel sud-est di Irian Jaya, Nuova Guinea, ma le ricerche si sono concentrate su Guam. La SLA/PDC di Guam rappresenta quindi il cluster più studiato ed è caratterizzata o da un progressivo di turbo demenziale con coinvolgimento motorio di tipo extrapiramidale parkinsoniano, o da una progressiva sindrome del motoneurone simile alla SLA. Meno frequentemente entrambi i fenotipi coincidono. La descrizione classica della neuropatologia della SLA/PDC è stata quella di un disturbo caratterizzato da grovigli neurofibrillari (NFT) nella patologia, ma con assenza di un significativo deposito di amiloide nell'Alzheimer. Recenti studi neuropatologici della SLA/PDC descrivono questo disturbo come la malattia della 'matassa', basata sulla variabile anatomica peso, con caratteristiche biochimiche simili al morbo di Alzheimer combinato a specie tau 3R e 4R e, poiché altri spettri di malattie neurodegenerative hanno una comune patologia molecolare, si pensa che questi spettri comprendano cluster di sindromi correlate, mostrando diversi fenotipi clinici a causa della variabile della distribuzione anatomica del sistema nervoso (Ince e Codd, 2005).

Mentre gli studi tradizionali si sono basati soprattutto su caratteristiche istopatologiche nella classificazione di questi disturbi, gli studi neuropatologici più recenti li classificano sempre più spesso in base a qualità biologiche. Questi studi rivelano che tutte le forme della SLA/PDC sono caratterizzate da una taupatia con atrofia corticale, perdita neuronale e numerosi grovigli neurofibrillari (NFT), ampiamente distribuiti in tutto il sistema nervoso centrale, simili a quelli osservati nella demenza di Alzheimer (AD). I sintomi clinici sono andati da SLA relativamente pura, al Parkinsonismo con demenza, fino ad una demenza piena. Si è visto però che la distribuzione dei NFT neocorticali assomiglia ad una taupatia più rara (la paralisi sopranucleare progressiva, PSP), e la tipica patologia alfa-sinucleina positiva del Corpo di Lewy (LB), riscontrata prima soprattutto nel PD, è stata identificata nella sostanza nera (*substantia nigra*) e nell'amigdala di pazienti PDC Guamaniani. Questi disturbi sia con la patologia tau che con la patologia  $\alpha$ -sinucleina, sono spesso caratterizzati da aggregati all'interno almeno di un gruppo di neuroni dell'amigdala. Non è chiaro se la presenza di entrambe le patologie all'interno dello stesso neurone rappresenti un evento casuale o se ci sia un'interazione per promuovere la loro aggregazione reciproca (Papapetropoulos, 2007).

Le prove che dimostrano inclusioni di "sola ubiquitina" nella SLA/PDC sono deboli, ci sono evidenze per un  $\alpha$ -sinucleinopatia nella SLA/PDC, ma la componente parkinsoniana della

malattia non è causata dalla malattia del Corpo di Lewy ed è segnalata un'alta prevalenza di  $\alpha$ -sinucleinopatia 'accidentale' in casi sporadici di AD che coinvolgono la sostanza nera. Le principali ipotesi associate alla eziopatogenesi della SLA/PDC sono ambientali e si sono concentrate soprattutto sulla neurotossina BMAA.

## Storia di Guam

Nel corso del 16° e 17° secolo nell'isola di Guam (sfruttata come colonia) c'era una popolazione di 60.000-100.000 Indiani Chamorro, mentre nel 1901 fu rilevata una popolazione di 9.676 persone (46 erano Chamorro).

Nel 1904 a Guam si ebbe la prima elevata incidenza di SLA/PDC e nel 1940 (dopo l'occupazione Giapponese durante la guerra) si verificò una grave epidemia di SLA/PDC (conosciuta a Guam come Lytico-Bodig): inizialmente questo complesso era caratterizzato dal disturbo motorio della proteina Lytico, un disturbo neurologico simile alla SLA, mentre più tardi i fenotipi clinici mostravano le caratteristiche alterate (varie manifestazioni motorie extrapiramidali, in particolare parkinsonismo) con l'emergere di Bodig come forma predominante di malattia, fino ad assumere prevalentemente caratteristiche di demenza.

La malattia (in tutte e tre le forme) ha avuto un'incidenza e una prevalenza considerevolmente ridotte nel corso degli ultimi 4 decenni (a livelli di 7/100000) rispetto ai tassi di incidenza descritti nel resto del mondo. La malattia sembra anche che si sia evoluta nel tempo presentandosi prevalentemente in modo clinico come parkinsonismo e demenza, piuttosto che come SLA, suggerendo una causa della malattia ambientale e non genetica (Banack, 2010a). Tuttavia i casi della SLA/PDC sono ancora rilevanti e sotto studio: la neurotossina BMAA è stata indicata come possibile agente eziologico del Complesso Sclerosi Laterale amiotrofica/parkinsonismo-demenza (SLA/PDC).

## L'ipotesi del legame causale

La BMAA è stata isolata per la prima volta da Vega e Bell (1967) dai semi di *Cycas micronesica* (Cicadee), una gimnosperma utilizzata dalla popolazione indigena Chamorro di Guam per la produzione di una farina utilizzata in tortillas, gnocchi e minestre. Il gruppo notò somiglianze superficiali tra i segni e i sintomi della malattia Chamorro, originariamente conosciuta come Lytico-Bodig (ora chiamata Complesso Sclerosi Laterale Amiotrofica/Parkinsonismo-Demenza, SLA/PDC), e il latirismo, e si chiese se l'acido  $\beta$ -N-Ossalil-L- $\alpha$ - $\beta$ -diamminopropionico (BOAA), ritenuto responsabile, si trovasse nei semi di cicadacee. Usando l'elettroforesi ad alta tensione, nel 1967 i ricercatori isolarono un nuovo aminoacido non proteico, chiamato acido  $\beta$ -N-metil- $\beta$ - $\alpha$ -diaminopropanoico (MeDAP), che ora è conosciuto come  $\beta$ -N-metilammino-L-alanina (BMAA).

La scoperta della BMAA nella farina ha suggerito che questa neurotossina potesse causare la SLA/PDC attraverso il consumo di questo alimento, utilizzato frequentemente dai Chamorro di Guam. Questa ipotesi è stata formulata per la prima volta nel 1950 ed è stata poi ripresa da Spencer *et al.* (1987) in seguito alla scoperta che l'aminoacido non proteico  $\beta$ -N-metilammino-L-alanina (BMAA) si trovava nei tessuti di cicadacee sull'isola di Guam.

L'aminoacido era una potente eccitotossina a livello dei recettori del glutammato e poteva indurre un disturbo neurologico nei macachi attraverso una somministrazione orale, causando alterazioni degenerative motorie ed extrapiramidali. La somministrazione della BMAA ai

macachi portava a deficit neurologici, ma gli effetti erano acuti e non portavano alla neurodegenerazione progressiva.

L'ipotesi che la BMAA fosse l'agente eziologico della SLA/PDC fu poi abbandonata quando successivamente si vide che la farina di cicadea lavata conteneva una bassa quantità di tossine come la BMAA.

Oltre alla BMAA, l'altra tossina neurotossica prodotta dalle Cicadee è la cycasina, un componente glicosidico che ha effetti epatotossici e cancerogeni immediati, ma ha minimi effetti neurotossici: viene solitamente rimossa dal lavaggio della farina di cicadea.

L'attenzione quindi si è concentrata sulla BMAA.

L'ipotesi della BMAA come causa presunta della SLA/PDC venne inizialmente contestata: la principale critica sosteneva che c'era una bassa concentrazione di tossine nella farina lavata insufficiente per provocare una malattia neurodegenerativa nell'uomo.

Secondo Duncan *et al.* (1990), infatti, erano necessarie alte concentrazioni di BMAA per indurre nell'uomo alterazioni comportamentali e morte neuronale: l'uomo avrebbe dovuto ingerire 1500 kg di farina trasformata delle cicadee nel corso di un periodo di 12 settimane per sviluppare la stessa malattia prodotta nelle scimmie da Spencer *et al.* (1987).

Inoltre, siccome i Chamorro conoscevano la tossicità della farina delle cicadee, usavano lavarla bene per eliminare le tossine.

La malattia prodotta nelle scimmie era un modello classico di tossicità acuta/subacuta e non portava ad una neurodegenerazione progressiva che invece era caratterizzata da una lunga latenza.

## La SLA/PDC e la dieta tradizionale Chamorro

L'ipotesi che la BMAA possa essere coinvolta nella eziologia della malattia neurodegenerativa progressiva, il Complesso Sclerosi Laterale Amiotrofica/Parkinsonismo-Demenza (SLA/PDC) Guamaniano, ha recentemente riguadagnato attenzione quando si è scoperto che la tossina è biomagnificata all'interno dell'ecosistema di Guam e si trova nei tessuti cerebrali di Chamorro che sono morti di SLA/PDC, ma non nei pazienti deceduti per cause non correlate a malattie neurodegenerative.

### La biomagnificazione della BMAA nell'ecosistema di Guam

Cox e Sacks (2002) hanno condotto un ulteriore esame del possibile collegamento tra la tradizionale dieta Chamorro e il complesso SLA/PDC di Guam notando che nell'alimentazione di questa popolazione hanno sempre avuto un ruolo molto importante i pipistrelli della frutta (*Pteropus tokudae* e *P. mariannus*), chiamati anche volpi volanti. Secondo i ricercatori il declino del complesso SLA/PDC nel popolo Chamorro riflette il declino delle volpi volanti a Guam. Essi hanno collegato l'esposizione a concentrazioni molto alte di BMAA con il consumo di volpi volanti che si nutrono di semi di cicadee e sono considerati una prelibatezza dagli indigeni (Cox, 2006). Hanno così portato ad una variante dell'ipotesi Cycad (presentando per la prima volta un fattore eziologico ambientale): se gli animali (come i pipistrelli della frutta) che foraggiano sui semi di Cicadee biomagnificano le tossine, allora i Chamorro che consumano questi animali potrebbero essere esposti ad alte concentrazioni di quelle neurotossine.

Questa ipotesi è stata supportata da nuove evidenze epidemiologiche in cui si fa riferimento al fatto che la Lytico-Bodig sia una malattia quasi esclusiva degli abitanti Chamorro di Guam poiché non colpisce i residenti non-Chamorro, e i migranti da Guam presentano tassi di

incidenza di SLA/PDC non superiori a quelli della popolazione che li ospita. Inoltre non è noto un consumo di pipistrelli della frutta negli altri due foci ad alta incidenza della SLA/PDC (in Giappone o in Nuova Guinea).

Soprattutto viene messa in correlazione la variazione del tasso di incidenza della SLA/PDC tra i Chamorro nel corso degli anni al variare del numero di pipistrelli nativi di Guam, da cui emerge che la maggiore incidenza di questa malattia è corrisposta storicamente ad una elevata presenza di pipistrelli della frutta nativi, la cui quasi estinzione (a causa dell'aumento della caccia), ha portato alla stragrande importazione di pipistrelli (circa 230000 tra il 1975 e il 1990) dalle isole del Pacifico in cui le cicadee contenenti BMAA non sono native. Il numero di pipistrelli a Guam è andato da più di 50000 (nel 1900), a 3000 (nel 1958) fino a raggiungere una quantità esigua inferiore a 50 unità (nel 1978) (Ince e Codd, 2005).

Cox *et al.* (2003) hanno scoperto che la BMAA viene sintetizzata dai cianobatteri simbiotici Nostoc azoto-fissatori che vivono nelle radici coralloidi delle piante Cycad piuttosto che nelle piante stesse: i cianobatteri a vita libera producono circa 0,3 µg/g di BMAA, mentre come simbiotici nelle radici coralloidi degli alberi di cicadee producono 2-37 µg/g di BMAA. La BMAA è concentrata poi nei tessuti riproduttivi in via di sviluppo della cycadea *Cycas micronesica* (9 µg/g per il seme carnoso e 1161 µg/g BMAA nello strato più esterno dei semi, 50 volte maggiore della concentrazione delle radici colonizzate dai cianobatteri). La BMAA è stata trovata ad una concentrazione media di 3556 µg/g nelle volpi volanti, le quali foraggiano sui semi di *C. micronesica*, mostrando quindi un aumento di circa 100 volte per ogni livello trofico. Le volpi volanti (*Pteropus mariannus* e *P. tokudae*) vengono consumate intere dagli indigeni Chamorro, bollite in crema di cocco.

I Chamorro che muoiono del complesso sclerosi laterale amiotrofica/Parkinsonismo-demenza

(SLA/PDC), hanno una media di 6,6 µg/g BMAA nei loro tessuti cerebrali, ma l'aminoacido neurotossico non è stato rilevato nei pazienti deceduti per cause non correlate a malattie neurodegenerative. La biomagnificazione della BMAA attraverso l'ecosistema di Guam si adatta al classico triangolo di concentrazioni crescenti di sostanze tossiche nella catena alimentare: i livelli di BMAA aumentano notevolmente (circa 100 volte per ogni livello trofico), raggiungendo valori molto elevati nelle volpi volanti (10000 volte superiori a quelli di colture di Nostoc axeniche) (Cox, 2003; Cox, 2005).

## PRODUZIONE NEI CIANOBATTERI E BIOACCUMULO

La scoperta della BMAA nel tessuto cerebrale di malati di Alzheimer provenienti dal Canada ha per la prima volta suggerito che la biomagnificazione della BMAA cianobatterica non potesse essere caratteristica della sola Guam, spingendo in tal modo la ricerca di questa neurotossina verso quegli ecosistemi acquatici o terrestri in cui si è potuto sospettarne la presenza, per verificare la possibilità di un legame tra BMAA e le malattie neurodegenerative.

Dal momento che le cicadee non fanno parte della flora canadese, questa scoperta ha suggerito la possibilità che fonte della BMAA nei pazienti Canadesi malati di Alzheimer potessero essere i cianobatteri. Inoltre la scoperta della BMAA, oltre che nelle radici simbiotiche dei cianobatteri del genere *Nostoc* anche in altre simbiosi cianobatteri-pianta (*Azolla filiculoides*, 2 µg/g, simbiosi con *Anabaena azollae*; e *Gunnera kauaiensis*, 4 µg/g, simbiosi con *Nostoc punctiforme*), ha portato ad esaminarne la produzione nei generi di cianobatteri a vita libera delle cinque sezioni morfologiche principali e nei cianobatterici simbiotici (ceppi *Nostoc*), isolati dai licheni e da piante ospiti di un'ampia varietà tassonomica provenienti da tutto il mondo. Utilizzando una derivatizzazione fluorescente di aminoacidi accoppiata con HPLC per quantificare la BMAA libera e associata alle proteine per ogni campione, e la cromatografia liquida – spettrometria di massa (LC-MS) per la conferma dei risultati, Cox *et al.* (2005) hanno potuto rilevare la produzione della BMAA

- nel 73% (8 su 11) dei ceppi *Nostoc* isolati dalla relazione simbiotica con i licheni e con piante ospiti di un'ampia varietà tassonomica;
- in oltre il 95% (20 su 21) dei generi di cianobatteri a vita libera analizzati, in tutte e 5 le sezioni cianobatteriche;
- nel 97% (29 su 30) dei ceppi analizzati.

Essendo i cianobatteri ubiquitari (in quanto tra i più diffusi, abbondanti, e antichi organismi sulla Terra), la scoperta che tutte e cinque le sezioni cianobatteriche, il 95% di tutti i generi di cianobatteri a vita libera (terrestri e di acqua dolce, salmastra e marina) e il 97% dei ceppi di cianobatteri analizzati producono BMAA assume un significato sia ecologico che evolutivo.

### Significato ecologico

Fino al 2003 la nozione della presenza della BMAA solo nelle cicadee ha fatto pensare che l'esposizione umana a questa neurotossina, e i relativi rischi connessi, fossero limitati solo agli ambienti dove le cicadee crescono (tropicali e sub/tropicali) e a quei popoli indigeni che mangiavano i prodotti in cui la BMAA si accumula in quei luoghi (farina dei semi di *Cycas*, volpi volanti).

C'è ora la possibilità che, date le giuste condizioni (fase di crescita e/o fasi del ciclo della vita), tutti i cianobatteri siano in grado di produrre BMAA; poiché i cianobatteri sono ubiquitari (nei diversi ambienti terrestri e acquatici), la BMAA può essere prodotta dai cianobatteri dei più diversi ambienti ed ecosistemi di tutto il mondo, ampliando in maniera esponenziale le potenzialità della sua distribuzione e la quantità totale rilasciata dall'ambiente; poiché i cianobatteri funzionano come produttori primari in molte catene alimentari, è probabile che le popolazioni umane distanti da Guam possano essere esposte a questa neurotossina ambientale, aumentando in modo preoccupante i rischi per la salute.

La BMAA potrebbe essere trasferita agli esseri umani mediante il consumo diretto dei cianobatteri o di ospiti di cianobatteri; attraverso il bioaccumulo nelle catene alimentari

supplementari (invertebrati, pesci e animali da pascolo utilizzati per il consumo umano che consumano i cianobatteri direttamente o indirettamente, alimentandosi di piante o animali che a loro volta si sono nutriti di cianobatteri, accumulando la BMAA; attraverso l'esposizione a rifornimenti idrici contaminati dai cianobatteri (es. acqua potabile, acqua per attività ricreative).

## Significato evolutivo

La produzione diffusa della BMAA da parte dei cianobatteri di tutto il mondo potrebbe rappresentare una sinapomorfia, ossia un carattere evolutivo comune conservato che unisce i cianobatteri come gruppo; è probabile che la BMAA sia stata prodotta molto tempo prima della evoluzione degli organismi con i sistemi neuronal.

Dalla scoperta di Cox *et al.* (2005), sulla produzione generalizzata di BMAA da parte praticamente di tutti i cianobatteri, indicante quindi la possibile diffusione della neurotossina in tutti gli ambienti ed ecosistemi del mondo, amplificante la possibilità di esposizione umana e dei rischi connessi per la salute, la ricerca verso la BMAA si è intensificata allo scopo di monitorare la presenza di questa biotossina.

Banack *et al.* (2007) hanno rilevato la BMAA in colture da laboratorio di una specie marina di Nostoc a vita libera, utilizzando cinque differenti metodi analitici (HPLC-FD, UPLC-UV, analizzatore di aminoacidi, LC/MS, e triplo quadrupolo/MS/MS).

Gli studi successivi hanno confermato la presenza diffusa della BMAA in una varietà di ambienti ed ecosistemi di tutto il mondo riportando la presenza di fioriture di cianobatteri sia in ambienti d'acqua dolce che d'acqua marina, indicando la possibilità di esposizione umana attraverso il consumo diretto dell'acqua (o l'infiltrazione di acque di lago contenenti BMAA in pozzi artesiani) (Banack, 2010a), le attività ricreative (es. nuoto e sci d'acqua) nelle aree con fioriture di cianobatteri, ma anche il consumo di pesce contaminato (come crostacei, molluschi e alcuni tipi di pesci). Varie concentrazioni di BMAA sono state trovate nei cianobatteri (*Nostoc commune*, produce in media 10 µg/g di BMAA) consumati (direttamente o mediante insalate, zuppe, carne) dagli abitanti degli altopiani peruviani, e nei cianobatteri (*Nostoc flagelliforme*, in media 0,66 µg/g di BMAA) che vengono mangiati nel brodo "fa cai" in Cina. La BMAA (BMAA libera: 0-276 µg/g; BMAA associata alle proteine: 6-48 µg/g) è stata trovata anche in campioni liofilizzati di cianobatteri provenienti da corpi idrici del Regno Unito (utilizzati per l'acqua potabile o per la ricreazione o per entrambe) dimostrando la coesistenza della BMAA con altre tossine cianobatteriche, con il rischio di ingenerare un effetto cumulativo.

Anche l'analisi del materiale di deposito delle acque urbane nei Paesi Bassi ha rivelato la presenza di BMAA.

Una serie di ricerche hanno evidenziato che la BMAA senza dubbio si trova all'interno di altri organismi al di fuori dell'ecosistema Guam, provando il bioaccumulo anche in ambienti marini come la Florida del Sud (in cui sono state trovate alte concentrazioni di BMAA in crostacei, molluschi e alcuni pesci, soprattutto quelli che si nutrono di benthos) e nel Mar Baltico (dove sono state trovate alte concentrazioni nei pesci che vivono sul fondo e nei molluschi filtratori), dimostrando che la BMAA potrebbe bioaccumularsi negli ambienti marini, anche se per confermare questa tesi si rendono necessari ulteriori studi. Caller *et al.* (2009) hanno collegato un'alta incidenza di SLA sporadica (maggiore di quasi 25 volte l'incidenza attesa) in 9 (poi diventati 11) pazienti affetti da SLA che vivevano nei pressi del lago Mascoma a Enfield, NH alla possibile esposizione ad una tossina cianobatterica proveniente dalle fioriture di cianobatteri del lago (frequenti in molti altri laghi del NH).

## Produzione mista ad altre cianotossine nei corpi idrici britannici

Metcalf *et al.* (2008) hanno rilevato la  $\beta$ -*N*-metilammino-L-alanina in ognuno dei 12 campioni ambientali analizzati, comprese le fioriture di cianobatteri, gli scum e i sedimenti bentonici, raccolti nel corso di un periodo di 14 anni tra il 1990 e il 2004 nei corpi idrici del Regno Unito e conservati a -20 °C. I campioni provenivano da 11 laghi d'acqua dolce e da 1 corpo idrico salmastro, comprendenti sette corpi idrici utilizzati per l'estrazione e il trattamento dell'acqua potabile, quattro dei quali utilizzati anche come acque ad uso ricreativo (pesca) e uno per l'abbeveraggio del bestiame. La presenza della BMAA in questi campioni è stata dimostrata mediante HPLC con rilevamento a fluorescenza e spettrometria di massa a triplo quadrupolo dopo derivatizzazione. La BMAA era presente sia come aminoacido libero che associato alle proteine, con concentrazioni comprese tra 8 e 287  $\mu\text{g/g}$  di cianobatteri per peso secco. Dieci dei campioni ambientali analizzati contenevano in più delle cianotossine (incluse microcistine, anatoossina-a, nodularina e saxitossine) al momento della raccolta del campione. Cinque dei campioni erano associati a animali morti, ascrivibili al momento della raccolta del campione alla presenza di microcistine, nodularine o anatoossina-a.

I campioni ambientali erano composti da uno o più dei seguenti generi di cianobatteri: *Microcystis*, *Planktothrix*, *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Gomphosphaeria*, *Nodularia*, *Pseudanabaena* e *Oscillatoria*.

Questi campioni raccolti dal 1990 al 2004 indicano che la BMAA può trovarsi nei corpi idrici insieme ad altre cianotossine conosciute. Molteplici tipi di cianotossine possono essere prodotti da singoli ceppi di cianobatteri e possono coesistere insieme nelle popolazioni ambientali (es. microcistine più anatoossina-a; nodularina più microcistine; e tutti i tipi sopraindicati più lipopolisaccaridi).

La coesistenza della BMAA con altre cianotossine, tra cui le neurotossine, può essere molto importante: infatti in colture di cellule spinali la BMAA da sola a basse concentrazioni probabilmente non causa neurodegenerazione, mentre potenzia il danno neuronale causato da una serie di altri agenti neurotossici.

Come detto in precedenza, la morte di animali in seguito all'esposizione ai cianobatteri campionati in molti dei corpi idrici del Regno Unito è stata attribuita a cianotossine come la microcistina, l'anatoossina-a e la nodularina. Queste intossicazioni indicano che questi animali sono stati esposti alla BMAA a base acquosa di origine cianobatterica anche in questi siti, ma ciò non vuol dire che essa abbia contribuito in maniera decisiva alla tossicità acuta, o sia associata alla mortalità degli animali, mentre è più probabile che possa contribuire all'intossicazione cronica, e questo possa comportare l'incorporazione della neurotossina in un serbatoio di proteine endogene a rilascio lento, con un possibile ritardo di anni o decenni tra l'esposizione e l'effetto. La scoperta della presenza della BMAA in 4 campioni dei corpi idrici utilizzati per il trattamento dell'acqua potabile, indica che l'esposizione umana può essere diversificata in una varietà di habitat e di routes.

## Il cianobatterio *Nostoc commune*, utilizzato come alimento negli altopiani peruviani dalle popolazioni indigene

Johnson *et al.* (2008), mediante l'analisi con 4 differenti tecniche analitiche (HPLC-FD, UPLC-UV, UPLC/MS, LC/MS/MS) di 21 diverse colonie sferiche di *Nostoc commune* provenienti da 7 raccolte diverse acquistate nei mercati di Cusco, hanno ricercato l'eventuale presenza della BMAA nel cianobatterio *Nostoc commune* (*Nostocales*), un alimento stagionale (conosciuto come *llullucha*) molto importante per le popolazioni indigene degli altopiani peruviani, che viene mangiato (soprattutto per le sue proprietà nutrizionali) da solo, o in uno stufato locale (*picante*). Le colonie globulari del *Nostoc commune*, raccolte dalle popolazioni indigene nelle riserve primaverili e nei laghi degli altopiani, a volte vengono consumate sul posto, scambiate con il mais o vendute, e infine arrivano nei mercati popolari di Cusco e di zone vicine. Ricerche precedenti hanno scoperto che *Nostoc commune* produce degli aminoacidi insoliti, tra cui quelli del gruppo micosporine (che forse prevengono i danni UV), e anche insolite proteine da stress idrico. È stato segnalato inoltre che in Cina (in particolare nella zona di Chengdu) mangiano la tradizionale zuppa *fa cai* a base di *Nostoc flagelliforme*. Al momento, però, mancano ancora abbastanza dati che diano la conoscenza dell'incidenza di malattie neurodegenerative progressive tra gli indigeni degli altopiani peruviani e altri popoli (es. nella zona di Chengdu in Cina) che consumano regolarmente cianobatteri, impedendo di poter stabilire se ci sia una correlazione con la presenza di BMAA. Una maggiore ricerca in tal senso sarebbe molto importante.

## I cianobatteri sudafricani

Esterhuizen e Downing nel 2008 hanno sviluppato un nuovo metodo per la rilevazione della BMAA nei campioni biologici, allo scopo di indagarne la produzione da parte dei cianobatteri isolati dagli arginamenti d'acqua dolce in Sud Africa, che vengono utilizzati come fonti di approvvigionamento di acqua potabile e acqua di irrigazione, e valutare l'esistenza di eventuali correlazioni tassonomiche o geografiche.

Il metodo di derivatizzazione e di rilevazione da essi descritto è semplice, rapido, riproducibile ed estremamente sensibile. I campioni di colture che rappresentano la diversità tassonomica e la distribuzione geografica in Sud Africa, raccolti e resi monospecifici con metodi standard su mezzi di coltura solidi BG-11 e BG-110, sono stati analizzati mediante gascromatografia-spettrometria di massa (GC-MS) con pre-derivatizzazione degli aminoacidi: la BMAA è stata trovata nel 96% delle colture analizzate, anche se presente in concentrazioni notevolmente inferiori a quelle delle colture di ceppi di *Nodularia* pubblicate da Cox *et al.* nel 2005, diverse sotto il limite di quantificazione.

La notevole differenza trovata nel contenuto di BMAA tra gli estratti provenienti da fasi di coltura diversa per lo stesso ceppo è stata ipotizzata esser dovuta a diversi fattori (condizioni di crescita, età e storia della coltura, stress ambientali o nutrizionali). Non è stata osservata nessuna correlazione tra le concentrazioni di BMAA (libera o associata alle proteine) all'interno o tra gruppi tassonomici, o con la provenienza geografica.

## Le catene alimentari acquatiche della Florida del Sud

Per determinare se la BMAA sia presente e possa biomagnificarsi nelle catene alimentari acquatiche, Brand *et al.* (2009) hanno esaminato diverse fioriture cianobatteriche nei corpi idrici della Florida del Sud, e misurato la quantità di BMAA presente negli animali che vivono in questo ecosistema acquatico, comprese le specie utilizzate nell'alimentazione umana, trovando alte concentrazioni di BMAA in molti crostacei. In particolare i gamberi rosa nella Florida Bay hanno mostrato alte concentrazioni di BMAA, paragonabili a quelle trovate nei pipistrelli della frutta di Guam (3556 µg/g). Le 17 specie di gamberi rosa e granchi blu nel sud della Biscayne Bay hanno mostrato una vasta gamma di concentrazioni. Tutte le tre specie di pesci del fiume Caloosahatchee River avevano alte concentrazioni di BMAA simili a quelle dei pipistrelli della frutta di Guam, mentre i molluschi filtratori nel fiume Caloosahatchee River e nell'estuario avevano solo una moderata quantità di BMAA. I dentici grigi nel sud della Florida Bay avevano moderate quantità di BMAA, mentre i dentici grigi nel nord della Biscayne Bay non avevano BMAA.

Questi risultati non hanno evidenziato un modello classico di biomagnificazione, perché i carnivori superiori come il barracuda e i dentici grigi non contenevano BMAA, mentre le specie in prossimità della parte inferiore della catena alimentare, come il gambero rosa, il pesce palla e l'orata avevano concentrazioni relativamente alte; è stato visto però che le specie che si nutrono del benthos (ad eccezione del pesce chiodo) avevano maggiori concentrazioni di BMAA, mentre le specie che si nutrono di plancton mostravano concentrazioni più basse. Le alici, i latterini, le aguglie e i barracuda che si nutrono nella colonna d'acqua non hanno mostrato BMAA, mentre nei gamberetti, nei granchi blu, nei pesci palla, e nei pesci vacca che si nutrono sul fondo sono state trovate alte concentrazioni.

Però i risultati ottenuti da Cox *et al.* (2005) suggeriscono che questo modello può esistere, in quanto hanno trovato una variazione di 500 volte nella quantità di BMAA prodotta dai cianobatteri. Questa variazione potrebbe dipendere in alcuni casi da differenze genetiche, in altri da differenze ambientali, ma anche dall'assorbimento differenziale e dall'escrezione, e un ruolo importante potrebbe essere rappresentato sia dall'età degli animali (gli animali più vecchi accumulano più BMAA) che dalla durata dell'esposizione a BMAA nel corso della vita di un animale.

Questi dati, forniti da Brand *et al.* (2009) sulle concentrazioni di BMAA negli animali che fanno parte delle catene alimentari acquatiche della Florida del Sud, indicano e confermano che la situazione di Guam non è unica: alte concentrazioni di BMAA sono state trovate in animali acquatici, in fioriture di cianobatteri nei corpi idrici naturali, in habitat ricchi di nutrienti come stagni per l'acquacoltura e risaie allagate con alte concentrazioni di cianobatteri, come anche in suoli utilizzati per l'agricoltura in tutto il mondo.

L'aumento della popolazione umana sulla terra porta ad un aumento del flusso di liquami, di fertilizzanti in agricoltura, di deiezioni degli animali di allevamento e di erosione del suolo verso gli habitat acquatici, favorendo un aumento generale delle fioriture di cianobatteri, che si prevede aumenteranno ancora. Si prevede quindi che anche l'esposizione umana ai cianobatteri e alla BMAA aumenterà, portando a un possibile pericolo per la salute attraverso l'incidenza di malattie neurodegenerative come morbo di Alzheimer, morbo di Parkinson e SLA.

In effetti il tasso delle tre malattie neurodegenerative è in aumento; si sa che la tendenza è influenzata dalla suscettibilità a queste malattie, ma alcuni fattori ambientali probabilmente svolgono un ruolo importante, e la BMAA potrebbe essere un fattore ambientale significativo.

## L'ecosistema acquatico temperato: il Mar Baltico

Cox *et al.* (2005) hanno dimostrato che colture di ceppi di cianobatteri azoto-fissatori *Nodularia* e *Aphanizomenon* producono la  $\beta$ -*N*-metilammino-L-alanina.

Questi 2 generi di cianobatteri compongono la maggior parte delle fioriture cianobatteriche di superficie del Mar Baltico, svolgendo un ruolo di estrema importanza in quanto, grazie alla loro capacità fotosintetica e azoto-fissatrice, costituiscono una base nella rete trofica del Mar Baltico, funzionando da produttori primari.

Il Mar Baltico è un ecosistema di acqua salmastra altamente produttivo, che raccoglie un bacino idrografico di circa 90 milioni di persone appartenenti a nove Paesi, nel corso dei millenni rifornisce dei servizi di questo ecosistema acquatico temperato.

Allo scopo di verificare l'ipotesi della produzione di BMAA da popolazioni naturali di cianobatteri in un clima temperato, e del possibile bioaccumulo negli organismi dei livelli trofici più alti, compresi quelli utilizzati per il consumo umano, Jonasson *et al.* (2010) hanno utilizzato un nuovo metodo di estrazione della BMAA: estrazione in fase solida, seguita da derivatizzazione pre-colonna e analisi da parte di HPLCMS/MS, per cercare di superare i problemi analitici di coeluzione dell'isomero strutturale della BMAA, l'acido  $\alpha$ - $\beta$ -diamminobutirrico (DAB), con la BMAA durante la separazione con HPLC, falsando il risultato.

### Cianobatteri e zooplancton

Il plancton è stato raccolto da giugno a settembre 2007 e 2008 nelle acque di superficie di una stazione costiera e di una stazione d'acqua aperta nel Mar Baltico.

L'analisi dei campioni cianobatterici ha mostrato differenze nella loro composizione tra le varie date di campionamento: nella stazione costiera, durante la stagione di crescita (giugno-luglio), *Aphanizomenon spp.* è stato il genere più abbondante, mentre ad agosto ci sono state uguali quantità di *Aphanizomenon spp.* e di *Nodularia spp.*; la stazione d'acqua aperta è stata popolata quasi esclusivamente da *Nodularia spp.* L'analisi HPLC-MS/MS ha mostrato la presenza di BMAA (da 0,001 a 0,015  $\mu$ g/g di peso secco) in tutti i campioni di cianobatteri in entrambe le stazioni e per le due stagioni, seppur variando di livello sia tra le stazioni che tra le date di campionamento, ma i livelli di BMAA sono risultati più elevati (in media 6 volte superiori) nello zooplancton, che si nutre soprattutto sui cianobatteri, rispetto ai cianobatteri stessi.

### Vertebrati e invertebrati

Sempre mediante HPLC-MS/MS, Jonasson *et al.* (2010) hanno analizzato i diversi campioni di vertebrati del Mar Baltico, compresi i generi di pesci *Osmers eperlanus* (sperlano, omero americano), *Scophthalmus maximus* (rombo), *Trigloporus quadricornis* (scazzone baltico), *Clupea harengus* (aringa), *Coregonus lavaretus* (coregone), *Sander lucioperca* (lucio), e di invertebrati bentici *Mytilus edulis* (cozza) e *Ostrea edulis* (ostrica) coltivati per il consumo umano sulla costa occidentale della Svezia, priva di fioriture cianobatteriche massicce presenti in altre parti del Mar Baltico. BMAA è stata rilevata in diversi campioni di pesci, con livelli che sono variati all'interno delle specie (fino a livelli 200 volte superiori in alcuni tessuti del pesce), ma sono stati costanti all'interno dello stesso organismo, indicando un bioaccumulo all'interno di questo ecosistema.

Lo stesso gruppo ha scoperto, inoltre, alti livelli di BMAA nei pesci che vivono vicino al fondo del Mar Baltico (*S. maximus*, *T. quadricornis*, e *O. eperlanus*) rispetto ai pesci pelagici, (alcuni dei quali non hanno presentato BMAA) e alti livelli nei molluschi filtratori d'acqua (*M. edulis* e *Q. edulis*) raccolti sulla costa occidentale della Svezia (un ecosistema completamente marino, con probabilmente solo una popolazione di cianobatteri bentonici, che non fiorisce). Inoltre, il tessuto cerebrale di *O. eperlanus*, *S. maximus* (da 0,99 a 1,29 µg/g di peso secco di BMAA), e *T. quadricornis* hanno manifestato livelli di BMAA fino a 82 volte superiori rispetto al loro tessuto muscolare, mentre in *C. lavaretus* i livelli sono risultati più alti nel tessuto muscolare rispetto al tessuto cerebrale e *C. harengus* ha mostrato bassi livelli di BMAA, ma simili nei due tessuti.

Questi alti livelli di BMAA nelle specie di pesci che vivono sul fondo del Mar Baltico potrebbero derivare dalla diminuzione e dalla decomposizione della BMAA nelle popolazioni cianobatteriche su cui si alimentano zooplancton e pesci più piccoli. Invece, il fatto che le specie di pesci della zona pelagica (*S. lucioperca* del Mar Baltico e *S. salar* dell'Oceano Atlantico del Nord) non abbiano bioaccumulato dimostra che la BMAA non si trova in tutti gli organismi eucarioti nello stesso momento, dipendendo dall'azione di meccanismi di regolazione potenzialmente correlati all'ecologia, all'età e allo stile di vita dei singoli organismi eucariotici.

Ad eccezione di *T. quadricornis*, le specie ittiche analizzate in questo studio vengono spesso consumate dall'uomo, e come detto precedentemente, livelli di BMAA, anche se bassi, sono stati trovati nella specie pelagica *C. harengus*, considerata una prelibatezza in Svezia.

Ma i livelli più alti di BMAA sono stati scoperti nel cervello dei pesci, che normalmente non viene consumato, per cui la popolazione umana potrebbe essere limitatamente esposta alla BMAA in questo ecosistema temperato (dei sei generi di pesci esaminati, solo *C. lavaretus*, il comune coregone, conteneva un livello relativamente alto di BMAA nel suo tessuto muscolare, 7 volte superiore rispetto a quello nei cianobatteri).

Secondo Jonasson *et al.* (2010), risulta più preoccupante la scoperta di alti livelli di BMAA nei molluschi filtratori d'acqua (*M. edulis* e *Q. edulis*) raccolti sulla costa occidentale della Svezia, in quanto la coltivazione di questi molluschi è in rapido aumento e il loro consumo potrebbe portare ad un trasferimento di BMAA nella popolazione umana.

I risultati ottenuti hanno dimostrato:

- la diffusione della neurotossina cianobatterica BMAA negli organismi procarioti ed eucarioti che vivono in un ecosistema acquatico temperato, quindi un ecosistema diverso e distante dall'ecosistema terrestre tropicale di Guam;
- la possibile diffusione e trasferimento della BMAA non solo tramite i cianobatteri, ma anche attraverso la catena alimentare acquatica con il consumo di pesci dei livelli trofici più elevati che vivono in ambienti acquatici pelagici e bentonici, e che ricevono la BMAA attraverso la loro alimentazione su organismi dello zooplancton che a loro volta si nutrono di cianobatteri.

La presenza e il trasferimento della BMAA all'interno di un ecosistema temperato può essere molto preoccupante per gli altri ecosistemi acquatici in tutto il mondo (limnetici e marini), e potrebbe dare una spiegazione della scoperta della BMAA nel tessuto cerebrale dei malati di Alzheimer in Canada e dei malati di SLA e di Alzheimer negli Stati Uniti. Sarebbe estremamente necessario intensificare le ricerche verso quegli organismi (come pesci e molluschi) che assumono una grande rilevanza nella dieta alimentare umana, andando ad analizzare anche il processo di bioaccumulo e di trasferimento della BMAA ed eventualmente di altre tossine (Jonasson *et al.*, 2010).

Facendo riferimento agli studi precedenti, i livelli di BMAA trovati nei cianobatteri dell'ecosistema acquatico temperato del Mar Baltico sono più bassi di due ordini di grandezza

rispetto a quelli trovati nell'ecosistema terrestre di Guam, probabilmente sia a causa di differenze biologiche che metodologiche.

Le differenze biologiche sono dovute al fatto che mentre i cianobatteri esaminati nell'ecosistema tropicale terrestre di Guam sono simbiotici, protetti e nutriti adeguatamente con tutte le sostanze nutritive necessarie dalla pianta ospite (*C. micronesica*), i cianobatteri planctonici nell'ecosistema acquatico temperato del Mar Baltico (estremamente povero di nutrienti e più "aperto") appartengono a generi differenti, e qui funzionano come produttori primari. Mentre i campioni cianobatterici provenienti da Guam sono stati esaminati mediante analisi con rilevamento a fluorescenza (HPLC-FD), non selettiva e con l'elevata possibilità di aver trovato sostanze coeluite, le analisi di Jonasson *et al.* (2010) sono state eseguite con HPLC-MS/MS, una tecnica sicuramente più selettiva e quindi con minore probabilità di trovare sostanze coeluite con la BMAA.

Questa scoperta suggerisce che è assolutamente necessario aumentare la ricerca della BMAA in organismi eucarioti importanti nella vita alimentare ed economica della nostra società, come i pesci e gli organismi filtratori, in modo da verificare un eventuale trasferimento in questi organismi e le quantità della tossina che questi eventualmente bioaccumulano attraverso le catene alimentari naturali.

## LOCALIZZAZIONE DELLA BMAA NEL TESSUTO CEREBRALE

### Tecniche utilizzate per rilevare la presenza di BMAA nel cervello umano colpito da SLA/PDC

Per rilevare la presenza di BMAA nei tessuti del cervello umano colpito da SLA/PDC sono state utilizzate 2 tecniche: il metodo convalidato al carbammato 6-aminochinolil-N-idrossisuccinimidile (AQC) e la cromatografia liquida/spettrometria di massa (LC/MS) per la conferma. Al contrario dei risultati precedenti, Montine *et al.* (2005), utilizzando una tecnica con derivatizzazione FMOC non convalidata, non hanno trovato BMAA libera nel complesso SLA/PDC o nei tessuti di controllo. Questo è stato spiegato da altri ricercatori con lo specifico metodo utilizzato, non convalidato e poco sensibile, e soprattutto con il fatto che i loro risultati non sono stati verificati con una seconda tecnica analitica come LC/MS o cromatografia a strato sottile (TLC).

### Distinzione della BMAA dal suo isomero strutturale 2,4-DAB

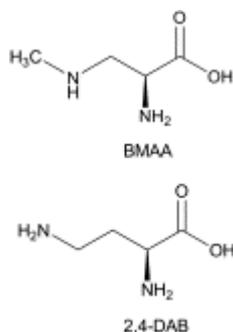
L'individuazione della BMAA mediante l'utilizzo di metodi di rilevazione diversi e nelle colture axeniche di cianobatteri così come nelle fioriture di cianobatteri dimostra che essa è ampiamente prodotta dai cianobatteri. Con le tecniche finora disponibili è più semplice la rilevazione di BMAA come composto purificato o in concentrazioni relativamente alte (come nei semi di cicadee) rispetto al rilevamento di BMAA endogena nelle matrici organiche complesse (come ad esempio nel tessuto cerebrale o nei cianobatteri), soprattutto a basse concentrazioni. Allo scopo di analizzare in maniera più precisa il presunto legame tra BMAA e alcune forme di malattie umane neurodegenerative progressive, poter fare un'analisi comparativa tra i laboratori, e quindi, determinare quali rischi la BMAA potrebbe comportare per la salute umana, bisognerebbe utilizzare campioni di riferimento standardizzati, in modo da poter definire metodi convalidati, accettati e riproducibili dai laboratori di tutto il mondo. Durante l'analisi, la BMAA può essere confusa con il suo isomero strutturale, l'acido 2,4-diamminobutirrico (2,4-DAB) (Figura 2), ma potrebbe anche succedere che i metodi di rilevamento attuali possano confondere con altri composti della tossina (Banack *et al.*, 2010b).

Per distinguere la BMAA dal 2,4-DAB, Krüger *et al.* (2010) hanno utilizzato un nuovo metodo LC-MS/MS a triplo quadrupolo che rileva gli unici prodotti ionici della BMAA e del 2,4-DAB. Nello specifico, essi hanno determinato la BMAA e il DAB nei cianobatteri e nei semi di *Cycas revoluta* e *Lathyrus latifolius*: sia gli aminoacidi neurotossici che quelli non proteinogenici sono stati analizzati senza derivatizzazione con l'obiettivo di creare un metodo di analisi con maggiore sensibilità di rilevamento.

La ricerca nei complessivi 62 campioni cianobatterici provenienti da tutto il mondo mediante l'applicazione di questo metodo ha rivelato l'assenza di BMAA in tali campioni, mentre è stata trovata una concentrazione di 6,96 µg/g di BMAA libera in *Cycas revoluta*.

Al contrario, l'isomero DAB è stato confermato in 16 campioni di cianobatteri (di cui un campione è distribuito come integratore nutrizionale) in concentrazioni di 0,07-0,83 µg/g, mentre i semi di *Lathyrus latifolius* contenevano 4,21 µg/g di DAB libero.

BMAA e 2,4-DAB sono stati costantemente separati e sono facilmente distinguibili gli uni dagli altri utilizzando almeno due diversi metodi di cromatografia liquida convalidati e ottimizzati (Banack *et al.*, 2010b).



**Figura 2. Formule di struttura degli isomeri neurotossici BMAA e 2,4-DAB**

Metodi specifici per separare BMAA da 2,4-DAB sono:

- cromatografia liquida ad alta prestazione con rivelatore a fluorescenza (HPLC-FD);
- cromatografia liquida ad ultra prestazione con rivelatore ad ultravioletti (UPLC-UV);
- UPLC con spettrometria di massa a quadrupolo singolo (UPLG-MS);
- cromatografia liquida-spettrometria di massa a triplo quadrupolo/spettrometria di massa (LC-MS/MS);
- cromatografia liquida ad ultra prestazione con spettrometria di massa a singolo quadrupolo (HPLC-MS);
- gascromatografia (GC);
- un metodo di risonanza magnetica nucleare (1H-NMR).

Il 2,4-DAB è stato usato come controllo standard di routine per HPLC-FD, UPLC-UV, UPLC-MS, LC-MS/MS e come analizzatore aminoacidico per analisi di BMAA per garantire l'adeguata separazione e la corretta identificazione basata sugli ioni prodotti nella LC a triplo quadrupolo - MS/MS.

I metodi LC e GC dovrebbero essere i più adatti per l'analisi di BMAA in quanto più sensibili e selettivi anche tenendo in considerazione la gamma dinamica.

Per cui, la BMAA può essere separata dal 2,4-DAB mediante HPLC in fase inversa e con analisi LC-MS/MS a triplo quadrupolo attraverso:

- tempi di ritenzione diversi;
- ioni diagnostici prodotti dalla dissociazione;
- rapporti costanti fra transizioni di monitoraggio della reazione selezionata (SRM).

La BMAA non derivatizzata può essere separata da 2,4-DAB con un analizzatore di aminoacidi con visualizzazione post-colonna utilizzando ninidrina.

Altri sistemi di analisi della BMAA nei campioni cianobatterici utilizzati finora:

- separazione con HPLC in fase inversa con rivelazione a fluorescenza, con il picco di controllo attraverso LC-MS a singolo quadrupolo o cromatografia su strato sottile;
- separazione GC con rilevazione MS a singolo quadrupolo;

- conferma con i derivatizzati e non derivatizzati della BMAA e con LC-MS/MS a triplo quadrupolo;
- AQC (carbammato 6-aminoquinolil-N-idrossisuccinimidile) o cloro formiato: la derivatizzazione per proteggere i gruppi aminici primari e secondari permette di individuare e distinguere molecole da composti strutturalmente simili aumentando il loro peso molecolare;
- analizzatore di aminoacidi Hitachi: in cui la BMAA non derivatizzata è separata, e visualizzata post-colonna con ninidrina in LC-MS mediante cromatografia liquida in fase inversa e con LC-MS/MS HILIC.

## BMAA libera e associata alle proteine

In seguito, è stato scoperto che la BMAA, oltre che in forma di aminoacido libero, può trovarsi anche in una forma legata alle proteine nei tessuti animali e vegetali: la forma legata è notevolmente più abbondante e potrebbe rappresentare un serbatoio endogeno persistente della tossina che potrebbe essere rilasciata (mediante idrolisi acida) durante il metabolismo delle proteine, fornendo così un meccanismo per spiegare gli effetti cronici. Questa frazione della BMAA legata alle proteine non è descritta nei primi risultati degli studi sia nei tessuti dei pipistrelli della frutta che nella farina, portando a una sottostima significativa della BMAA totale nella farina delle cicadee lavata (Cox *et al.*, 2006). I livelli di BMAA ottenuti in origine sono stati infatti acquisiti con metodi di estrazione standard, in cui avviene una macerazione dei tessuti che porta ad una frazione solubile ottenuta utilizzando acido tricloroacetico (TCA). Andando ad idrolizzare ulteriormente l'insolubile (ossia la frazione contenente le proteine) successivo all'estrazione del TCA, viene rilasciata la BMAA dalle proteine, andando a costituire un ulteriore serbatoio di "BMAA legata alle proteine". La farina dei semi di cicadee mostra poca BMAA libera, mentre dopo il lavaggio rilascia fino a 169 µg/g di BMAA per idrolisi acida. Queste frazioni di BMAA associate alle proteine di ogni organismo nella catena alimentare di Guam, in genere mostrano un incremento di 100 volte oltre la quantità di BMAA libera. L'incapacità di quantificare la BMAA legata alle proteine ha portato quindi ad una sottostima significativa della BMAA totale nella farina lavata delle cicadee (Murch *et al.*, 2004a, b).

## BMAA nel tessuto cerebrale

La scoperta della presenza della BMAA a Guam nella catena alimentare degli indigeni Chamorro e nei tessuti cerebrali dei Chamorro morti di SLA/PDC (concentrazione media di 627 µg/g della BMAA), ma non nei deceduti per cause non correlate alle malattie neurodegenerative, ha fornito la prima dimostrazione di un possibile legame tra la neurotossina e le malattie neurodegenerative progressive come la SLA/PDC di Guam, indicando che la biomagnificazione della BMAA cianobatterica non può essere unica per Guam. La BMAA è stata scoperta (in due studi successivi) anche nei tessuti cerebrali di 9 Canadesi malati di Alzheimer, ma non è stata rilevata nel tessuto cerebrale di altri 14 canadesi che sono morti per cause non collegate alla neurodegenerazione (Cox *et al.*, 2003; Murch *et al.*, 2004 b).

Questi risultati sono stati recentemente confermati in uno studio condotto da Pablo *et al.* (2009) che, oltre a studiare la BMAA presente nel tessuto cerebrale di canadesi affetti da morbo di Parkinson, (trovando una concentrazione media di 214 µg/g della BMAA), hanno anche

dimostrato che la BMAA si accumula nel cervello di pazienti statunitensi affetti da SLA (concentrazione media della BMAA pari a 268 µg/g), ma non in quello dei pazienti con malattia di Huntington, una malattia genetica neurodegenerativa (concentrazione media di 11 µg/g di BMAA) o in controlli non neurologici (concentrazione media di 41 µg/g di BMAA), suggerendo che la BMAA non si trova come un sottoprodotto della neurodegenerazione.

Nel primo studio condotto da Cox *et al.* (2003) sono stati misurati i livelli di BMAA libera e legata alle proteine:

- in campioni di tessuti cerebrali di persone Chamorro morte di PDC (cinque persone), o di SLA (una), o senza conoscere disturbi neurologici (due);
- in campioni di tessuti cerebrali di persone canadesi morte di AD (due) e altri che morirono di una serie di cause non neurologiche (tredici).

In 4 dei 5 casi di Chamorro morti di PDC sono stati trovati livelli rilevabili di BMAA libera (3,3-9,1 µg/g), mentre nel quinto caso la BMAA libera non è stata trovata (poiché al di sotto del limite di rilevazione). In tutti e cinque i casi PDC sono stati trovati livelli rilevabili della BMAA proteica (433-1190 µg/g). L'unico caso di SLA ha presentato 10,1 µg/g di BMAA libera e 610 µg/g di BMAA proteica.

In uno dei due campioni Chamorro senza malattia neurologica sono stati trovati 4,8 µg/g di BMAA libera e 82 µg/g della BMAA proteica, nell'altro la BMAA non è stata rilevata in nessuna delle due forme.

In tutti i campioni canadesi provenienti da persone morte per cause non neurologiche non è stata rilevata la BMAA (né libera, né proteica), mentre nei due casi AD sono stati trovati sia livelli della BMAA libera (3,4 e 9,7 µg/g) che proteica (220 e 264 µg/g).

Uno studio successivo (riportando solo i livelli della BMAA legata, 60-130 volte superiori a quelli della BMAA libera), ha confermato una possibile associazione tra AD e la BMAA: sono stati esaminati campioni provenienti da cinque aree differenti del cervello in altri sette canadesi morti di AD e in un paziente di controllo morto di una causa non neurologica. La BMAA non è stata rilevata nei tessuti del paziente di controllo, o in qualsiasi campione di uno dei sette pazienti canadesi con AD, mentre la BMAA è stata trovata nei campioni dei tessuti cerebrali degli altri sei malati di AD (25,9-235,6 µg/g). Questi risultati hanno fatto ipotizzare a Cox *et al.* che la forma della BMAA legata alle proteine agisca come serbatoio neurotossico a lungo termine nel tessuto cerebrale, e che la tossina potrebbe essere rilasciata attraverso il metabolismo della proteina normale, causando così danni neurologici.

## MECCANISMI MOLECOLARI DELLA BMAA

### Legame tra BMAA e neurotossicità/neurodegenerazione *in vitro* e *in vivo*

Nonostante siano stati proposti diversi meccanismi di tossicità della BMAA, il metabolismo di questa molecola è ancora poco conosciuto, mentre la neurofarmacologia è ben definita.

Molti studi *in vitro* hanno ottenuto risultati che sostengono l'ipotesi del legame tra BMAA e SLA/PDC contribuendo alla perdita selettiva dei neuroni motori, mentre alcuni studi non sono riusciti a dimostrare la neurotossicità della BMAA in modelli di roditori, probabilmente a causa delle differenze metodologiche, dei modelli animali, della sensibilità di specie.

La BMAA è un aminoacido non lipofilo e non essenziale che si trova sia in forma libera che legata alle proteine. BMAA si trova in entrambe le forme nel tessuto cerebrale dei pazienti Chamorro morti a causa della SLA/PDC, ma non nei controlli. In questa forma la BMAA potrebbe essere incorporata nelle proteine e in seguito portare alla loro denaturazione, funzionando come un serbatoio neurotossico endogeno per il futuro rilascio della neurotossina nelle cellule, che si accumulerebbe e sarebbe trasportata tra i livelli trofici e successivamente rilasciata durante il metabolismo delle proteine. All'interno dei tessuti cerebrali, essa potrebbe migliorare la formazione di aggregati proteici e agire quindi come un serbatoio neurotossico endogeno che rilascia lentamente la BMAA libera, causando in tal modo danni neurologici iniziali e ricorrenti per diversi anni, il che può spiegare il lungo periodo di latenza osservato per l'insorgenza della malattia neurologica tra i Chamorro (Murch, 2004a, b).

Il meccanismo di incorporazione della BMAA nelle proteine non è ancora noto, ma esso potrebbe portare alla denaturazione delle stesse (producendo proteine anormali o troncate sostituendosi ad aminoacidi normali durante la sintesi proteica, o attraverso l'interferenza con il metabolismo o la funzione di ioni metallici e/o di neurorecettori).

La BMAA si trova principalmente in una forma associata alle proteine che viene rilasciata solo dopo l'idrolisi acida in campioni cerebrali *post mortem* di Guamaniani malati di SLA/PDC.

La BMAA in forma libera somiglia strutturalmente al suo carbammato addotto, che si lega al glutammato e *in vitro* può mediare la degenerazione neuronale attraverso un meccanismo regolato dall'attivazione dei recettori dell'aminoacido eccitatorio (EAA) e/o di trasportatori del glutammato: la BMAA si lega direttamente ai recettori NMDA, e il legame è aumentato quando la BMAA è carbammato, producendo una molecola molto simile al glutammato.

I derivati carbamidici della BMAA sono agonisti sia di AMPA che di NMDA attivati da questi composti.

In colture dissociate miste del midollo spinale la BMAA è stata trovata indurre una selettiva perdita dei motoneuroni (MN) a basse concentrazioni (circa 30  $\mu\text{M}$ ) attraverso l'attivazione del recettore AMPA/kainato: sono state queste concentrazioni notevolmente inferiori a quelle trovate in precedenza ad indurre una diffusa degenerazione neuronale, rafforzando in tal modo l'ipotesi secondo la quale la BMAA può indurre selettiva perdita dei motoneuroni nella SLA/PDC (Rao, 2006).

Quindi, la BMAA agisce come un neuroeccitante dei recettori ionotropici del glutammato (NMDA, AMPA, Kainato) in colture di corteccia cerebrale organotipica di topo.

La BMAA agisce anche sui recettori metabotropici (mGluR) attivandoli ed è uno degli aminoacidi più avidi in chelanti  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  e  $\text{Ni}^{2+}$ .

Gli studi condotti su colture di cellule corticali hanno dimostrato che la BMAA è neurotossica sia in vivo che in vitro, ma sono necessarie concentrazioni molto elevate (1-3 mM) per indurre morte neuronale.

Questi risultati sono stati confermati da Lobner *et al.* (2007) in colture di cellule corticali, indicando che è poco probabile che la tossina da sola causi deficit neurologici (a meno che siano consumate concentrazioni molto elevate), ma a partire da concentrazioni di 10 µM la BMAA può potenziare il danno neurale indotto da altri insulti (compresa una predisposizione genetica), e potrebbe portare allo sviluppo di malattie neurodegenerative aumentandone il danno, accelerandone l'insorgenza, o prolungandone gli effetti.

Il meccanismo di neurotossicità della BMAA è in realtà triplice: coinvolge l'attivazione del recettore NMDA (mediante un'azione diretta), del recettore 5 per il glutammato (mGluR5) e anche l'induzione di stress ossidativo.

Liu *et al.* (2009) hanno trovato che la BMAA inibisce l'antiporto cistina/glutammato (sistema Xc(-) mediato dalla captazione della cistina, che a sua volta porta a deplezione di glutazione e all'aumento dello stress ossidativo: nel modello ciclico, la BMAA sembra guidare il rilascio di glutammato attraverso il sistema Xc (-) che induce tossicità attraverso l'attivazione del recettore mGluR5.

In esperimenti con preparati di tessuto di ratto, Nunn e Ponnusamy (2009) hanno trovato che la BMAA inibisce la sintesi e/o stimola la degradazione della glutammina a partire dal glutammato sia nelle fettine di cervello che nel mezzo di incubazione, probabilmente a causa dell'attivazione dei recettori NMDA da parte di carbammati della BMAA (formati dal bicarbonato/CO<sub>2</sub> e più abbondanti a livello dei recettori NMDA): questo significa che la BMAA comprometterebbe l'utilizzo del glucosio, la formazione dell'ATP e l'attività del ciclo glutammato-glutammina.

La natura essenzialmente non carica (gruppo 2-ammino deprotonato) della BMAA a pH 7.4 probabilmente spiega l'entrata dell'aminoacido nel cervello attraverso il trasportatore di aminoacidi neutri.

La reattività della BMAA con il piridossal-fosfato rappresenta una caratteristica potenzialmente pericolosa che può contribuire alla tossicità di tali composti. Nei loro esperimenti su fettine di cervello di ratto, il gruppo ha trovato anche una riduzione nelle concentrazioni della taurina, della serina e della glicina (probabilmente a causa dell'inibizione della loro sintesi da parte della BMAA) e un aumento delle concentrazioni dell'ammonio e dell'alanina ma non del glutammato (a causa della dismutazione della BMAA), trovando che la tossina produce metilammina (a valori di pH fisiologico mediante una reazione selettivamente veloce tra il gruppo 2-ammino della BMAA, solo parzialmente ionizzato a pH fisiologico, e il piridossal-5-fosfato).

Semplici modelli in vitro e nei primati come quelli di Spencer *et al.* (1987) supportano le prove della tossicità della BMAA.

La neurodegenerazione di specifiche popolazioni neuronali e le disfunzioni motorie e cognitive sono state indotte nei topi dalla somministrazione di farina di cicadea lavata. In contrasto con studi precedenti, Karlsson *et al.* (2009a) hanno dimostrato il trasferimento placentare della BMAA, con l'assorbimento pronunciato da parte del cervello fetale di topo nel 14° giorno di gestazione, il trasferimento attraverso la BEE (barriera ematoencefalica) al cervello neonatale e la localizzazione in aree distinte del cervello (l'ippocampo e lo striato).

Trattamenti ripetuti con la BMAA (200 o 600mg/kg) nei ratti nel periodo neonatale durante il picco massimo di Scatto di Crescita del Cervello (BGS, 9°-10° giorno) hanno indotto alterazioni acute come la compromissione delle capacità motorie e l'iperattività (la quale potrebbe essere stata causata dalla stimolazione del sistema glutammatergico da parte della BMAA).

I disturbi osservati indotti dalla BMAA come alterazioni nelle capacità motorie o nell'attività generale sono dovuti alla difficoltà di apprendimento spaziale; l'esposizione a BMAA durante il periodo di BGS crea perciò conseguenze a lungo termine per lo svolgimento delle funzioni del comportamento adulto e la possibile esposizione alla BMAA durante il BGS mediante cibo o acqua contaminati potrebbe essere un fattore di rischio molto importante per la salute umana (Karlsson, 2009b).

Riassumendo le attività neurotossiche della BMAA, si può dire che essa certamente: attiva i recettori ionotropici (AMPA, Kainato, NMDA) e i recettori metabotropici (mGluR) del glutammato (e induce degenerazione neuronale attraverso un meccanismo eccitotossico; causa la perdita selettiva dei motoneuroni in colture miste dissociate di midollo spinale a concentrazioni di circa 30  $\mu\text{M}$ ; induce stress ossidativo; a basse concentrazioni può influenzare la crescita dei neuriti e i livelli dei neurofilamenti proteici nelle cellule in coltura; altera la funzione proteica attraverso l'incorporazione nelle proteine; induce una degenerazione neuronale mediante un eccesso di attivazione dei recettori del glutammato, e c'è sempre più convinzione che i meccanismi eccitotossici che coinvolgono il glutammato facciano parte della patogenesi delle malattie umane neurodegenerative, comprese la SLA e l'AD. Inoltre, la BMAA a partire da concentrazioni di 10  $\mu\text{M}$  potenzia il danno indotto da altri insulti, e studi in vitro ne hanno dimostrato la tossicità a concentrazioni di 10-30  $\mu\text{M}$ .

## Latenza degli effetti

Poiché non è noto il tempo di latenza tra l'esposizione alla BMAA e l'insorgenza della neurodegenerazione, l'analisi dei migranti da e a Guam può darne una indicazione. La gente Chamorro che è emigrata in altre isole del Pacifico e più lontano, raramente sviluppa Lytico-Bodig e i loro tassi di SLA convenzionale, di morbo di Parkinson (PD) e di morbo di Alzheimer (AD) non sono superiori a quelli della popolazione circostante. L'analisi del rischio di sviluppo di SLA/PDC da parte dei migranti che risiedono a Guam per i primi 18 anni di vita, indica che la malattia si può sviluppare fino a 35 anni o più dopo l'arrivo nella nuova posizione geografica, ma la seconda generazione di questi immigrati che sono nati e risiedono nella nuova posizione geografica, non mostra un rischio più elevato per le malattie neurodegenerative (Monson, 2003).

Ventotto immigrati Chamorro provenienti da Guam hanno sviluppato la SLA/PDC dopo un periodo di assenza che va da 1 a 34 anni: se i fattori ambientali sono responsabili del periodo di latenza, per lo sviluppo della malattia possono quindi essere necessari più di tre decenni. Le stime dei tassi grezzi di mortalità da SLA per questi migranti sono almeno tre volte superiori ai tassi osservati per la popolazione degli Stati Uniti, ma più di quattro volte inferiori ai tassi grezzi di mortalità per SLA nei Chamorro non migranti viventi a Guam nel ventennio precedente lo studio. Dal punto di vista epidemiologico ciò indica che l'esposizione a cui i migranti sono stati sottoposti è avvenuta a Guam.

I filippini migrati a Guam segnalati per aver sviluppato la malattia neurologica progressiva dopo il loro arrivo sono stati: dieci con la SLA da 1 a 32 anni dopo il loro arrivo; due con parkinsonismo-demenza da 13 e 26 anni dopo l'arrivo, e sette altri pazienti con il più classico PD da 5 a 24 anni dopo il loro arrivo. Dieci bambini nati a Guam da genitori filippini e Chamorro hanno sviluppato la SLA e sei hanno sviluppato il PD. Il tasso medio annuo grezzo di mortalità per SLA tra i migranti filippini è stato stimato essere sei volte superiore a quelli che vivono negli Stati Uniti continentali, ma la metà del tasso osservato tra i Chamorro viventi a Guam nello stesso periodo (Garruto, 1980).

È probabile che si verifichino interazioni gene-ambiente che rendono alcune persone più sensibili all'esposizione, per cui occorrono ulteriori ricerche per chiarire tutti questi punti irrisolti.

## **Metabolismo ed effetti metabolici in sistemi modello, in tessuti neurali, in altri tessuti murini *in vitro***

I ratti trattati con BMAA rilasciano L- $\alpha$ -N-acetil derivato, che è l'unico metabolita conosciuto della BMAA negli animali, e sembra sia formato dalla N-acetilazione mediante acetil-CoA, l' $\alpha$ -N-acetil derivato da BMAA, mentre il trattamento della BMAA con L-amminoacidoossidasi ha portato alla sua ossidazione. Duncan *et al.* (1991) hanno studiato *in vitro* in maniera approfondita il metabolismo della BMAA in un certo numero di tessuti di ratto, senza tuttavia ottenere risultati in merito, nel corso di una incubazione di due ore di tali tessuti con omogenati ma riuscendo, dopo sette giorni, a trovare nelle urine e nelle feci di ratto meno del 10% di una dose iniettata della [14CH3]-BMAA: questo fa supporre che avvenga un notevole metabolismo di questa neurotossina nel corso di tale periodo.

Mash *et al.* (2008) hanno trovato che il gruppo metile triziato della molecola di BMAA viene perso rapidamente dal fegato e dal rene di ratto *in vivo*, ma persiste nel cervello.

Il metabolismo della BMAA è stato ultimamente studiato da Nunn e Ponnusamy (2009) che hanno esaminato gli aspetti (osservando la comparsa di metaboliti specifici derivati dall'aminoacido in questione) e gli effetti metabolici della BMAA in una serie di tessuti di ratto *in vitro*, confermando che la tossina è una molecola molto reattiva, partecipante sia alle reazioni enzimatiche che non enzimatiche. Lo studio e i relativi risultati da essi ottenuti forniscono informazioni importantissime su aspetti ancora poco conosciuti del metabolismo di questa neurotossina.

### **Metodo sperimentale e metabolismo della BMAA**

Nunn e Ponnusamy (2009) hanno impiegato preparati di tessuto di ratto con una singola e relativamente alta concentrazione di BMAA, utilizzando un sistema di analisi ad ampio spettro con rilevamento mediante ninidrina. Per realizzare esperimenti modello con piridossal-5-fosfato, hanno utilizzato 1H NMR e rilevazione con ninidrina. A differenza di esperimenti utilizzando omogenati, i risultati ottenuti con fette di cervello possono essere complicati da eventi che coinvolgono i recettori sia ionotropici che metabotropici, e richiedono quindi cellule intatte: si parla, in questo caso, di complesso di speciazione molecolare di BMAA in terreni contenenti bicarbonato/CO<sub>2</sub>. In questi esperimenti modello la BMAA ha reagito non-enzimaticamente con il piridossal-5-fosfato rilasciando sia ammonio che metilammina. La metilammina è stata prodotta dagli omogenati del tessuto in cui potrebbero essere coinvolte anche altre reazioni (enzimatiche o non-enzimatiche). Anche il piridossale ha reagito con la BMAA in modo analogo a quello del derivato fosforilato, rilasciando però meno metilammina.

### **Chimica-fisica**

Martin (1978) ha esaminato gli effetti degli spostamenti fisici dei gruppi amminici in acidi diammino-mono-carbossilici. Nella BMAA vi è grande prossimità dei 2 gruppi amminici, così come avviene per l'acido 2,3-diamminopropanoico: questa caratteristica sembrerebbe essere la

ragione per cui le reazioni dei due composti con bicarbonato e con alcuni ioni metallici si somigliano. L'acido 2,3-diaminopropanoico (2,3-DAB) e la BMAA condividono quindi i bassi valori di pKa dei 2 gruppi amminici ( $pK_{a2} = 6,50$ ): questo determina che a valori di pH fisiologico queste molecole non assumono una carica netta. Per la BMAA la carica negativa sul gruppo carbossile a pH 7 è bilanciata da una unità di carica positiva ripartita tra i gruppi 2-ammino e 3( $\beta$ )-metilammino. L'analisi matematica indica che circa l'84% del gruppo 2-ammino è non carico a pH 7, quindi esso è essenzialmente deprotonato a pH fisiologico (Vega e Bell, 1967). Il valore insolitamente basso di pKa del gruppo 2-ammino risulta in un bassa carica netta complessiva sulla molecola a valori di pH fisiologico. La carica negativa sul gruppo carbossilico è bilanciata da una unità di carica positiva condivisa tra i gruppi 2-ammino e 3( $\beta$ )-metilammino. Lo stato in gran parte privo di carica del gruppo 2-ammino significa che esso è libero di reagire in condizioni in cui un gruppo amminico prevalentemente a carica positiva (tipica della maggior parte degli aminoacidi nelle stesse condizioni) sarebbe reattivo (Nunn e Ponnusamy, 2009).

La natura essenzialmente non carica della BMAA a pH 7.4 probabilmente spiega l'ingresso dell'aminoacido nel cervello mediante il trasportatore di aminoacidi neutri. Nella maggior parte degli ambienti fisiologici, gli aminoacidi reagiscono solo in reazioni enzimatiche catalizzate in cui la carica positiva del gruppo amminico diventa deprotonata perché i gruppi amminici a carica negativa non sono chimicamente molto reattivi. Inoltre, il fatto che in ambiente fisiologico il gruppo 2-ammino della BMAA è pressoché scarico spiega la sua reattività con il piridossal-5-fosfato rappresentando una caratteristica potenzialmente pericolosa che può contribuire alla tossicità di tali composti. La L-alanina non reagisce con il piridossal-5-fosfato a valori fisiologici di pH (che è anche la condizione sperimentale in cui Nunn e Ponnusamy hanno lavorato nei loro esperimenti), perché a tale pH il suo gruppo 2-ammino possiede una carica positiva.

### **Effetti su taurina, serina e glicina cerebrali**

Nunn e Ponnusamy (2009), nei loro esperimenti su fettine di cervello, hanno rilevato una riduzione nelle concentrazioni di taurina, serina e glicina dovuta probabilmente all'inibizione della loro sintesi da parte della BMAA. Essi hanno anche rilevato l'aumento di concentrazione dei tre aminoacidi nell'ambiente di incubazione, il che suggerisce che la BMAA stimoli la perdita di questi composti mediante un meccanismo di scambio, utilizzando sistemi di trasporto specifici o generali. La perdita di taurina, serina e glicina dal tessuto e il guadagno di questi composti nell'ambiente di incubazione suggeriscono che la BMAA colpisca il trasporto di tutti e tre gli aminoacidi.

Confrontando strutturalmente la BMAA con l'aminoacido libero taurina, un osmolita organico che svolge un ruolo molto importante nella regolazione del volume cellulare, risulta che i 2 aminoacidi a pH 7 sono simili sia nelle dimensioni molecolari che nella distribuzione di carica. La taurina viene accumulata dal liquido extracellulare per mezzo di un sistema di trasporto, presumibilmente un sistema TauT. La grande perdita di taurina proveniente da fettine di cervello che si è verificata in questi esperimenti è stata probabilmente causata dal diverso scambio di taurina e di BMAA, o anche dalla stimolazione del rilascio della taurina dal tronco cerebrale di topo immaturo da parte di entrambi i recettori ionotropici (AMPA e NMDA). I derivati carbamidici della BMAA sono agonisti sia di AMPA che di NMDA attivati da questi composti.

### **Effetti su ammonio e alanina cerebrali**

Un altro risultato di questi esperimenti è stato l'aumento delle concentrazioni dell'ammonio e dell'alanina nelle fettine di cervello nell'ambiente di incubazione, indicando che questi

composti sono stati sintetizzati all'interno del tessuto e successivamente persi da esso, mentre la concentrazione di glutammato del tessuto e dell'ambiente è rimasta invariata rispetto alla presenza di BMAA. Questi risultati possono essere spiegati con la dismutazione della BMAA che si è verificata negli esperimenti modello. Infatti la dismutazione di BMAA aumenterebbe le concentrazioni intracellulari di ammonio il quale, reagendo con il glutammato in una reazione di transaminazione, formerebbe l'alanina: entrambi i composti formati (ammonio formato e alanina) sarebbero poi persi dai tessuti. La dismutazione di BMAA dovrebbe anche rilasciare metilammina ma questa non è stata trovata, a causa forse della incapacità di rilevare i prodotti della metilammina metabolizzata da parte del sistema di analisi utilizzato.

## **Effetti della BMAA sulla glutammina**

La riduzione della concentrazione di glutammina sia nelle fettine di cervello che nel mezzo di incubazione indica che la BMAA inibisce la sintesi e/o stimola la degradazione della glutammina. La maggior parte del glucosio utilizzato nel ratto e nel sistema nervoso centrale umano *in vivo* è accoppiato al ciclo glutammato-glutammina. La glutammina viene sintetizzata negli astrociti a partire dal glutammato e dall'ammonio in una reazione endoergonica (ATP dipendente) catalizzata dalla glutammina sintetasi; la glutammina lascia gli astrociti e viene trasportata nei neuroni, dove viene idrolizzata mediante una reazione catalizzata dalla glutamminasi per il rilascio di glutammato e di ammonio. Questo significa che la BMAA comprometterebbe l'utilizzo del glucosio, la formazione di ATP e l'attività del ciclo glutammato-glutammina. Poiché la glutammina sintetasi è inibita dalla stimolazione dei recettori NMDA e le concentrazioni di glutammato sia nel tessuto che nell'ambiente di incubazione non sono state influenzate dalla BMAA, è probabile che l'inibizione della sintesi della glutammina a partire dal glutammato nelle fettine di cervello sia dovuta all'attivazione dei recettori NMDA da parte di carbammati della BMAA (formati dal bicarbonato/CO<sub>2</sub>). Le specie carbammato nel mezzo di incubazione delle fettine di cervello sono attive a livello dei recettori AMPA a basse concentrazioni, e sui recettori NMDA a concentrazioni più elevate.

## **Metilammina: un prodotto del metabolismo della BMAA**

La metilammina è stata prodotta dalla BMAA in esperimenti modello a valori di pH fisiologico, mediante una reazione selettivamente rapida (probabilmente una  $\alpha$ - $\beta$ -eliminazione) tra il gruppo 2-ammino di BMAA (solo parzialmente ionizzato a pH fisiologico) e il piridossal-5-fosfato. La formazione della metilammina è stata osservata anche in omogenati di fegato e di reni, ma non in fettine di cervello (probabilmente a causa della rapidità del suo metabolismo) o in omogenati. La reazione di formazione della metilammina è catalizzata probabilmente dalla treonina/serina deidratasi, in quanto questo enzima è stato trovato sia nei reni che nel fegato di ratto. Mediante una reazione che è catalizzata dall'aminossidasi sensibile alla semicarbazide, la metilammina è metabolizzata per cedere formaldeide, perossido di idrogeno e ammonio.

Di questi prodotti formati dalla metilammina, la formaldeide è stata implicata nella cerebrovascolarizzazione umana e nella reticolazione proteica in una varietà di tessuti, il perossido di idrogeno prende parte alla reazione di Fenton per produrre il radicale libero ossidrilico, e anche l'ammonio è neurotossico. Questo enzima svolge numerose funzioni, ma è difficile individuare i possibili percorsi seguiti dai prodotti di tale reazione. Nell'uomo si trova nel plasma del sangue, nel sistema vascolare (compresi i vasi sanguigni cerebrali), mentre non è presente nei neuroni e nelle cellule gliali. Nei vasi sanguigni cerebrali del cervello *postmortem* dei malati di Alzheimer è stato trovato un'aumento dell'immunoreattività di questo enzima: le proteine cross-linked, causate dalla

formaldeide e dalla metilammina catalizzata dall'amminossidasi sensibile alla semicarbazide, potrebbero accumularsi nelle pareti della cerebrovascolarizzazione, ma possono essere suscettibili alla degradazione da parte dei proteo somi; esse sono state identificate con un dosaggio sviluppato da Gubisne-Haberle *et al.* (2004). Nel fegato di ratto la metilammina inibisce la via lisosomiale di degradazione delle proteine. Il perossido di idrogeno può essere degradato dalla catalasi, o può raggiungere una concentrazione sufficiente per regolare i processi metabolici della formazione di legami disolfuro inter-proteina, o partecipare a ulteriori reazioni dei radicali liberi nelle cerebrovascolarizzazioni, limitando l'interazione tra queste ultime e il tessuto neurale. La cerebrovascolarizzazione è stata implicata nel morbo di Alzheimer e in altre malattie neurodegenerative, tra cui la sclerosi laterale amiotrofica. La metilammina si trova a basse concentrazioni nel plasma umano a seguito dell'ossidazione di sostanze endogene (come la creatina e l'adrenalina), e la somministrazione cronica della metilammina nei ratti produce uno stato di stress ossidativo, mentre la formaldeide induce aggregati di proteina tau a sotto forma di cellule neurotipiche SH-SY5Y (Nunn e Ponnusamy, 2009).

Secondo Karamyan e Speth (2008) un modello animale ideale avrebbe bisogno di imitare la capacità degli esseri umani a metabolizzare la BMAA, il tasso del possibile rilascio di metaboliti dal luogo di sintesi nel cervello e la gestione metabolica di tali metaboliti.

La difficoltà di trovare modelli animali adeguati è data dal fatto che questi processi probabilmente variano da specie a specie. Inoltre, l'attività dell'enzima responsabile della catalizzazione della degradazione di metilammina (amminossidasi sensibile alla semicarbazide) è maggiore nei tessuti umani che in quelli di topo e di maiale, ma in alcuni animali domestici e sperimentali l'attività dell'enzima nel plasma è notevolmente maggiore che negli esseri umani, mentre il ratto e la cavia, di tutte le specie esaminate, sono quelli con la più bassa attività di questo enzima.

Spencer *et al.* nel 1987, per dimostrare il legame della neurotossina BMAA e la SLA/PDC di Guam, hanno fatto esperimenti su macachi che, dopo essere stati alimentati con BMAA per 6-8 settimane, hanno manifestato espressioni facciali Parkinsoniane tipiche, mostrando poi un recupero selettivo mediante trattamento con L-DOPA (1 mg / kg, più un inibitore della decarbossilasi periferica). Spencer *et al.* (1987) hanno riportato solo lievi cambiamenti patologici nella sostanza nera (che è la zona cerebrale colpita nel morbo di Parkinson) nei macachi cronicamente esposti alla BMAA; questo significa che le caratteristiche Parkinsoniane sono state espresse senza perdita di neuroni.

Sembra probabile una possibile reazione tra la BMAA e il piridossal-5'-fosfato libero che ridurrebbe lo stato della vitamina B6 dei macachi: in questi esperimenti la BMAA può aver agito come un antagonista della vitamina B6.

Per cui negli esperimenti con le scimmie è possibile che l'esaurimento somatico dei componenti della vitamina B6 nei pazienti Guamaniani possa aver ridotto la quantità di dopamina disponibile per la normale neurotrasmissione.

## **Aumento della neurotossicità attraverso “meccanismi multipli”**

### **Sinergia tossica a basse concentrazioni**

Gli studi condotti su colture di cellule corticali hanno dimostrato che la BMAA è neurotossica sia *in vivo* che *in vitro*, ma sono necessarie concentrazioni molto elevate della BMAA (1-3 mM) per indurre morte neuronale.

Lobner *et al.* (2007) hanno ripetuto questi studi in colture di cellule corticali e hanno avuto risultati simili, in cui la BMAA da sola non induce alcuna tossicità significativa fino ad una concentrazione di 1 mM.

Andando poi a vedere gli effetti delle concentrazioni di 10, 50 e 100  $\mu\text{M}$  di BMAA, sia da sola che in combinazione con altri insulti che inducono bassi livelli di morte neuronale è stato scoperto che la BMAA a queste concentrazioni non provoca di per sé tossicità, ma a partire da concentrazioni di 10  $\mu\text{M}$  può potenziare il danno neurale indotto da altri insulti. In particolare, a 100  $\mu\text{M}$  o meno, la BMAA ha potenziato la tossicità di N-metil-D-aspartato (NMDA), ferro (Fe), buthionina sulfoximina (BSO),  $\beta$ -amiloide, e ione 1-metil-4-fenilpiridina (MPP +), mentre la più bassa concentrazione che ha provocato un effetto è stata a 10  $\mu\text{M}$  di BMAA, che ha causato il potenziamento della tossicità di  $\beta$ -amiloide e di MPP +.

Questa è la prima prova che la BMAA a concentrazioni inferiori all'intervallo di mM può aumentare la morte dei neuroni corticali, e illustra i potenziali effetti sinergici di tossine ambientali con patologie neurologiche.

### **Azione sul recettore NMDA**

È stato dimostrato che la BMAA attiva il recettore NMDA. Per determinare il meccanismo degli effetti della BMAA sulla morte neuronale, è stata indagata la tossicità indotta dall'esposizione ad una concentrazione di BMAA pari a 3 mM, che, producendo morte neuronale quasi completa, ha consentito di analizzare le azioni tossiche della BMAA senza gli effetti di altri insulti.

Studi precedenti (Ross, 1987; Weiss, 1989) hanno indicato che gli antagonisti del recettore NMDA proteggono contro la tossicità della BMAA. Lobner *et al.* (2007) hanno trovato che l'antagonista non competitivo del recettore NMDA, MK-801, blocca circa il 50% della tossicità di BMAA.

L'esposizione alla BMAA o a NMDA per 1 h ha indotto un aumento dell'afflusso di calcio, e l'aumento è stato in gran parte bloccato da MK-801 (il blocco dell'88% di BMAA ha indotto l'afflusso di  $45\text{Ca}^{2+}$ , il blocco del 96% di NMDA ha indotto la captazione di  $45\text{Ca}^{2+}$ ): la BMAA può causare la morte attraverso il recettore NMDA, ma il fatto che MK-801 riduce la tossicità della BMAA del 50% ha suggerito la presenza di ulteriori meccanismi di tossicità.

Per determinare se l'effetto della BMAA è diretto sul recettore NMDA, è stata eseguita l'elettrofisiologia *patch-clamp* cellulare su colture di neuroni corticali in cui la BMAA, inducendo una corrente dipendente dalla concentrazione, ha permesso di misurare questa corrente ad una concentrazione di 10  $\mu\text{M}$  e di vedere che la corrente è stata in gran parte mediata dall'attivazione dei recettori NMDA poiché l'antagonista competitivo del recettore NMDA, il D-amino-5-fosfonovalerato (APV), ha bloccato il 94% della corrente indotta da 3 mM di BMAA e tutta la corrente indotta da 100  $\mu\text{M}$  di BMAA.

Il fatto che la BMAA agisca in maniera diretta sul recettore NMDA attivandolo e potenziandone l'effetto è indicato dal fatto che la corrente indotta dalla tossina esisteva anche in condizioni di saturazione della glicina, e che la BMAA induce una significativa corrente anche a basse concentrazioni, mentre MK-801 protegge contro la sua tossicità ad elevata concentrazione.

## **Triplice meccanismo di neurotossicità: attivazione di NMDA e di mGluR5, induzione di stress ossidativo**

La scoperta di Lobner *et al.* (2007) che il blocco dei recettori NMDA fornisce una protezione incompleta (del 50%) contro la tossicità della BMAA ad elevate concentrazioni, ha indicato il coinvolgimento di altri due meccanismi. Oltre a MK-801, hanno fornito ulteriore protezione contro la tossicità di BMAA anche il 6-metil-2-[feniletinil]-piridina (MPEP), antagonista del recettore mGluR5, e lo spazzino dei radicali liberi, trolox. La combinazione di questi agenti ha agito mediante meccanismi distinti, e la loro combinazione ha fornito una protezione di gran lunga maggiore rispetto a quando sono singoli.

La grande tossicità indotta dall'attivazione di NMDA da parte della BMAA è dimostrata anche dal fatto che nessun composto è stato protettivo in assenza di MK-801.

La protezione conferita dal trolox suggerisce che la BMAA induce stress ossidativo.

Misurando lo stress ossidativo cellulare con il colorante fluorescente diclorofluoresceina (DCF), il gruppo ha riscontrato che l'esposizione a 3 mM di BMAA per 3 ore ha causato un aumento significativo dello stress ossidativo, che non è stato attenuato da MK-801 o da MPEP, ma è stato bloccato da trolox, con o senza MK-801. Il meccanismo con cui la BMAA induce lo stress ossidativo non è stato determinato ma è distinto dall'attivazione di NMDA e di mGluR5, poiché non viene bloccato da MK-801 o da MPEP.

Un possibile meccanismo per lo stress ossidativo indotto da BMAA è che essa inibisce l'antiporto cistina/glutamato che porta a una diminuzione di assorbimento della cistina e alla riduzione di glutazione intracellulare.

Nonostante MPEP fornisca protezione contro la tossicità della BMAA in presenza di MK-801, essa causa aumento dello stress ossidativo. L'inibizione del gruppo I di mGluR5 aumenta lo stress ossidativo. Questo effetto significa che MPEP agisce proteggendo contro la tossicità della BMAA non inibendo direttamente mGluR5 ma attraverso un altro meccanismo, come ad esempio l'inibizione della produzione di IP3 e il rilascio di calcio dai depositi intracellulari.

La BMAA potenzia il danno di alcuni insulti, indotti da agenti come NMDA, Fe, BSO,  $\beta$ -amiloide e MPP+, in modo selettivo e indipendentemente dal tipo di morte indotta dall'insulto (apoptosi o necrosi).

Nel sistema di coltura delle cellule corticali, le esposizioni ad agenti come NMDA, Fe, BSO e kainato inducono tutte necrosi ma, mentre la tossicità dei primi tre agenti è stata potenziata dalla BMAA, la tossicità del kainato non è stata aumentata. L'esposizione a C2-ceramide e alla staurosporina inducono apoptosi, ma questa non è stata aumentata dalla BMAA, mentre la tossicità di  $\beta$ -amiloide e di MPP+ induce sia apoptosi che necrosi, e il danno è potenziato dalla BMAA. La tossicità di  $\beta$ -amiloide è considerata un modello del morbo di Alzheimer e la tossicità di MPP+ un modello del morbo di Parkinson. La BMAA potenzia il danno di tutte queste lesioni inducendo lo stress ossidativo.

Poiché potenzia insulti specifici indotti da altri agenti tossici, la BMAA può aumentare la morte dei neuroni corticali a concentrazioni 100 volte più basse di quanto precedentemente indicato. A differenza dei neuroni corticali, i motoneuroni sono molto sensibili alla tossicità della BMAA anche senza un insulto aggiuntivo: la BMAA può indurre la morte selettiva dei motoneuroni a partire da 30  $\mu$ M. Siccome lo sviluppo della SLA/PDC sembra sia causato da una esposizione a lungo termine mentre questi studi hanno mostrato gli effetti di BMAA solo nel corso di un breve periodo di tempo (24 ore), è probabile che concentrazioni ancora più basse della neurotossina BMAA in lunghi periodi di esposizione possano aumentare la morte neuronale.

La maggior parte delle malattie neurodegenerative sembra coinvolgere eccitotossicità e stress ossidativo mediati dal recettore NMDA, e l'attivazione del recettore mGluR5 è stata implicata nel morbo di Parkinson.

Mentre studi precedenti sui topi avevano indicato che la somministrazione di BMAA non induceva deficit neurologici o la morte neuronale *in vivo*, i risultati ottenuti da Lobner *et al.* (2007) hanno suggerito che è poco probabile che la BMAA da sola causi deficit neurologici a meno che siano consumate concentrazioni molto elevate; la combinazione del consumo di bassi livelli di BMAA con altri insulti (compresa una predisposizione genetica) può invece portare allo sviluppo di malattie neurodegenerative aumentandone il danno, accelerandone l'insorgenza, o prolungandone gli effetti.

## **Esposizione a BMAA durante lo sviluppo: effetti a breve e a lungo termine**

Lo Scatto di Crescita del Cervello (BGS) è una tappa importante nello sviluppo del sistema nervoso centrale (SNC), caratterizzato da rapidi cambiamenti dello sviluppo neurologico come la crescita assonale e dendritica, lo stabilirsi di connessioni neuronali, la sinaptogenesi e la proliferazione delle cellule gliali seguita da mielinizzazione. Negli esseri umani il BGS inizia durante l'ultimo trimestre di gravidanza e termina almeno 2 anni dopo la nascita, mentre nei roditori dura le prime 3-4 settimane dopo la nascita. Il BGS è una fase sensibile all'esposizione a vari xenobiotici.

Il sistema glutammatergico è coinvolto nella modulazione di molti eventi che si verificano durante il BGS: infatti il glutammato fornisce funzioni trofiche al cervello in via di sviluppo influenzando la plasticità sinaptica, la crescita assonale e dendritica, il cono di crescita e di orientamento, la promozione della proliferazione e la migrazione delle cellule neuronali (Karlsson, 2009a; Karlsson, 2009b). L'esposizione alla BMAA nel periodo neonatale dei recettori ionotropici e metabotropici del glutammato agonisti della BMAA, in funzione del tempo di esposizione, potrebbe recare un'alterazione permanente delle funzioni cerebrali a causa di una possibile alterazione di uno o più dei processi influenzati dal glutammato e portare a ipoplasia e ad anomalie nella posizione dei neuroni, nell'orientamento di assoni e dendriti e nelle connessioni sinaptiche, che potrebbero tutti portare a disfunzioni cerebrali gravi.

I recettori del glutammato e le loro subunità sono regolati in modo differenziale durante lo sviluppo, con eterogeneità di espressione regionale e temporale, e spesso con livelli di picco transitori durante la BGS.

## **Somministrazione neonatale di BMAA ai Roditori: captazione selettiva ed effetti comportamentali**

Non si sa molto sugli effetti a breve e a lungo termine derivanti dall'esposizione alla BMAA durante lo sviluppo: esperimenti precedenti non hanno trovato effetti comportamentali considerevoli somministrando la BMAA (500 mg/kg) nei ratti il 5° giorno postnatale (PND).

Karlsson *et al.* (2009a) hanno studiato il trasferimento (captazione e distribuzione) della BMAA nel cervello fetale e neonatale di topo (utilizzando autoradiografia) e gli effetti della BMAA sullo sviluppo di caratteristiche comportamentali durante lo scatto di crescita del cervello (BGS) nei ratti neonati e giovani. Lo studio autoradiografico ha rivelato il trasferimento transplacentare della 3H-BMAA dopo una singola iniezione endovenosa nei topi in stato di gravidanza al 14° giorno di gestazione, e un aumento della radioattività nel cervello neonatale e

nel midollo spinale da 30 minuti a 24 h dopo una singola iniezione sottocutanea di 3H-BMAA in topi di 10 giorni di età. La radioattività è stata trovata in maniera specifica nell'ippocampo, nello striato, nel tronco encefalico, nel midollo spinale e nel cervelletto di topi di 10 giorni di età. Studi recenti nei topi adulti hanno suggerito che l'ippocampo è la popolazione neuronale nel cervello più sensibile alla BMAA.

Questo studio ha perciò dimostrato il trasferimento placentare della BMAA, con l'assorbimento pronunciato da parte del cervello fetale di topo nel 14° giorno di gestazione, il trasferimento attraverso la BEE (barriera emato-encefalica) al cervello neonatale e la localizzazione in aree distinte del cervello come l'ippocampo e lo striato. Questi risultati sono in contrasto con studi precedenti che hanno rivelato uno scarso trasferimento della BMAA attraverso la barriera emato-encefalica (BEE) nei topi adulti, e nessuna localizzazione in regioni distinte del cervello.

L'accesso della BMAA al cervello del roditore adulto sembra essere limitato dal grande trasportatore di aminoacidi neutri nella barriera emato-encefalica (BEE).

La BEE in via di sviluppo ha caratteristiche differenti da quella degli adulti: negli adulti infatti, alcuni aminoacidi hanno bisogno di muoversi attraverso la barriera emato-encefalica più facilmente per permettere la rapida crescita del cervello, mentre la BEE in via di sviluppo può permettere agli xenobiotici di entrare nel cervello. In base a ciò, la captazione della 3HBMAA marcata nel cervello in via di sviluppo può essere collegata al trasporto facilitato attraverso la barriera. Trattamenti ripetuti con la BMAA (200 o 600 mg/kg) nei ratti neonati durante il picco massimo di BGS (PND 9°-10°) hanno indotto alterazioni acute come la compromissione delle capacità motorie e l'iperattività (la quale potrebbe essere stata causata dalla stimolazione del sistema glutammatergico da parte del BMAA).

Inoltre, i ratti con la dose elevata di BMAA non sono riusciti ad abituarsi alla prova ambientale durante il test in età giovanile, indicando deficit nelle funzioni di apprendimento.

### **Esposizione a BMAA nel periodo neonatale in ratti adulti: danni cognitivi a lungo termine**

Karlsson *et al.* (2009b) hanno studiato gli effetti comportamentali a lungo termine nei ratti adulti in seguito alla somministrazione di BMAA (200 o 600 mg/kg mediante iniezione subcutanea) nel periodo neonatale (nei giorni 9-10 dopo la nascita) andando ad indagare i profili comportamentali, il comportamento simile all'ansia, l'apprendimento, e i meccanismi della memoria. L'apprendimento e la memoria spaziale sono stati studiati in età adulta, utilizzando il test del labirinto del braccio radiale.

I risultati dei test comportamentali indicano che i disturbi osservati indotti dalla BMAA non sono dovuti ad alterazioni nelle capacità motorie o nell'attività generale, ma alla difficoltà di apprendimento spaziale. La somministrazione neonatale di BMAA potrebbe comportare effetti secondari lungo l'asse ipotalamo-ipofisi-surrene (HPA), con conseguenze a lungo termine per l'apprendimento e la memoria: non c'è stata differenza nei livelli sierici basali di corticosterone negli animali trattati con la BMAA, indicando che gli effetti osservati a lungo termine durante la BGS non sono stati secondari ad una alterata funzione basale dell'asse HPA. I risultati ottenuti con il test EPM, in cui si è avuta un'aumentata attività del braccio aperto che è una caratteristica del basso comportamento simile all'ansia, indicano che l'esposizione neonatale a BMAA può provocare effetti a lungo termine sulla reattività emozionale. Il test OF e il test MCSF non hanno evidenziato differenze nelle capacità motorie o attività locomotorie in età adulta. Quindi, questi risultati mostrano che l'esposizione alla BMAA durante il BGS (che è un periodo critico dello sviluppo del SNC) ha conseguenze a lungo termine per lo svolgimento delle attività del comportamento adulto, evidenziando deficit nell'apprendimento spaziale (rilevato nel test

RAM). Il meccanismo che causa queste alterazioni non si conosce, ma visto che i risultati in questione riflettono quelli di studi precedenti riportanti danni cognitivi negli animali adulti esposti alla BMAA nella BGS del periodo neonatale, si potrebbe dedurre una funzione del sistema glutammatergico (importante regolatore del BGS) nei cambiamenti indotti da BMAA. La possibile esposizione alla BMAA durante il BGS attraverso cibo o acqua contaminati potrebbe essere un fattore di rischio molto importante per la salute umana (Karlsson, 2009b).

## CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE

I cianobatteri sono tra i più diffusi e abbondanti organismi presenti sulla Terra, sono cosmopoliti e ubiquitari, possono trovarsi in una varietà di ambienti ed ecosistemi, terrestri e acquatici, di tutto il mondo: acque dolci, salmastre e marine, rocce e terreni, ambienti estremi, sia come organismi simbiotici che a vita libera. Sono associati ad un aumento massiccio delle fioriture algali nocive (HABs) in tutto il mondo, dovute ad un aumento dell'eutrofizzazione degli ambienti acquatici: questo è il principale risultato di una maggiore mobilitazione di nutrienti a causa dell'accrescersi della popolazione umana e del maluso delle acque, che genera un aumento del deflusso di sostanze nutritive provenienti dai fertilizzanti, dai rifiuti di origine animale, dalle acque reflue e dall'erosione del suolo. Oltre a questo gioca il suo ruolo molto importante il riscaldamento globale. I cianobatteri hanno la capacità di produrre una vasta gamma di metaboliti secondari, e molti di questi sono tossine nocive per gli animali e gli esseri umani.

Nell'ambito delle nuove tossine scoperte merita sicuramente un posto di primo piano la neurotossina  $\beta$ -N-metilammino-L-alanina (BMAA), un aminoacido altamente neurotossico che, come mostrato da evidenze di laboratorio, date le giuste condizioni (fase di crescita e/o fasi del ciclo della vita) può essere prodotto praticamente da tutte le specie di cianobatteri. L'ubiquità dei cianobatteri fa sì che questa neurotossina possa essere prodotta nei più diversi ambienti ed ecosistemi di tutto il mondo, ampliando in maniera esponenziale le potenzialità della sua distribuzione e la quantità totale rilasciata nell'ambiente, aumentando quindi il rischio di esposizione umana.

L'esposizione degli esseri umani alla BMAA potrebbe avvenire mediante un consumo diretto dei cianobatteri o dei loro ospiti, l'esposizione ad approvvigionamenti idrici (come l'acqua potabile e le attività ricreative acquatiche), il bioaccumulo nelle catene alimentari acquatiche e terrestri (invertebrati, pesci e animali da pascolo utilizzati per il consumo umano che consumano direttamente o indirettamente i cianobatteri alimentandosi di piante o animali che a loro volta si sono nutriti di cianobatteri, accumulando la BMAA). La produzione di BMAA da parte di pressoché tutti i ceppi di cianobatteri e la conseguente ampia diffusione di questa neurotossina sono supportate e confermate dai risultati delle analisi di laboratorio. La BMAA è stata trovata in una grande varietà di ecosistemi in cui sono presenti fioriture cianobatteriche, in colture di laboratorio di una specie marina a vita libera di *Nostoc*, nei cianobatteri consumati (direttamente o indirettamente) dagli abitanti degli altopiani peruviani e delle zone rurali della Cina. Corpi idrici del Regno Unito (utilizzati per l'acqua potabile o per la ricreazione o perentrambe) hanno mostrato la coesistenza della BMAA con altre tossine cianobatteriche.

In colture di cellule corticali a partire da concentrazioni di 10  $\mu$ M, la BMAA può potenziare il danno neurale indotto da altri insulti (compresa una predisposizione genetica) e potrebbe portare allo sviluppo di malattie neurodegenerative aumentandone il danno, accelerandone l'insorgenza, o prolungandone gli effetti.

La presenza di questa tossina è stata anche segnalata in ceppi di cianobatteri sudafricani, nel materiale di deposito delle acque urbane nei Paesi Bassi, ma anche in catene alimentari acquatiche della Florida del Sud in cui sono state trovate alte concentrazioni in crostacei, nei molluschi e in alcuni pesci, soprattutto quelli che si nutrono di benthos. Alte concentrazioni di BMAA sono state trovate in animali acquatici, nelle fioriture di cianobatteri che si trovano nei corpi idrici naturali, in habitat ricchi di nutrienti come stagni per l'acquacoltura e risaie allagate che hanno alte concentrazioni di cianobatteri e anche in suoli utilizzati per l'agricoltura distribuiti in tutto il mondo.

La scoperta nel mar Baltico (un ecosistema temperato) di alte concentrazioni di BMAA in organismi di livelli trofici elevati che si nutrono direttamente o indirettamente di cianobatteri, come ad esempio lo zooplankton, e in diversi vertebrati (pesci) e invertebrati (molluschi, ostriche), comprese le specie pelagiche e bentoniche dei pesci utilizzati per il consumo umano, ha suggerito percorsi di esposizione umana in cui il consumo di questi pesci contaminati da parte della popolazione potrebbe portare al trasferimento della neurotossina nell'uomo. Secondo il gruppo di Jonasson *et al.* (2010), la scoperta della biosintesi regolare della neurotossina BMAA in un grande ecosistema acquatico temperato come il Mar Baltico, combinata con il suo possibile trasferimento e il suo bioaccumulo nelle principali catene alimentari, con fine nel consumo umano, è allarmante e richiede attenzione.

Questi autori suggeriscono che è assolutamente necessario estendere le ricerche della BMAA ad organismi eucarioti importanti nella vita alimentare ed economica della nostra società che rappresenterebbero fonti per l'esposizione umana, come i pesci e gli organismi filtratori, in modo da verificare un eventuale trasferimento della tossina in questi organismi e le quantità da questi eventualmente bioaccumulate attraverso le catene alimentari naturali, permettendo così di valutare i reali rischi connessi per la popolazione umana.

Fino al 2003 la conoscenza della presenza della BMAA solo nelle cicadee ha fatto pensare che l'esposizione umana a questa neurotossina e i relativi rischi fossero limitati solo agli ambienti tropicali e sub/tropicali dove le cicadee crescono, e a quei popoli indigeni che mangiavano prodotti in cui la BMAA si accumulava (es. farina di semi di cicadee, volpi volanti).

La BMAA è stata indicata come il possibile agente eziologico del Complesso Sclerosi Laterale Amiotrofica/Parkinsonismo-Demenza (SLA /PDC), detto anche Demenza di Guam, un disturbo neurologico progressivo che presenta sintomi simili alla SLA, al Morbo di Parkinson (PD) e al Morbo di Alzheimer (AD), in particolare caratterizzata da un progressivo disturbo demenziale (simile all'AD) con il coinvolgimento motorio di tipo extrapiramidale (parkinsoniano) o da una progressiva sindrome del motoneurone simile alla SLA. Meno frequentemente entrambi i fenotipi coincidono. L'altissimo tasso di incidenza della SLA/PDC tra il popolo Chamorro di Guam (da 50 a 100 volte superiore rispetto ai tassi di incidenza in altri luoghi), ha fatto ipotizzare che la BMAA fosse responsabile di questo disturbo neurologico progressivo mediante il consumo di semi di cicadee contenenti questa neurotossina. Dopo essere stata inizialmente abbandonata, questa ipotesi è stata ripresa quando si è scoperto che la BMAA biomagnifica all'interno della catena alimentare del popolo Chamorro di Guam, aumentando verso i livelli trofici superiori (circa 100 volte per ogni livello trofico) fino a raggiungere valori molto elevati nelle volpi volanti (10000 volte superiori a quelli di colture di *Nostoc axeniche*). Nell'ecosistema di Guam la BMAA viene sintetizzata dai cianobatteri simbiotici azoto-fissatori del genere *Nostoc* che vivono nelle radici coralloidi delle piante cicadee (Cox *et al.*, 2003).

La BMAA è stata trovata nei tessuti cerebrali di Chamorro che sono morti di SLA/PDC (con una media di 627 µg/g della BMAA), ma non nei pazienti Chamorro deceduti per cause non correlate a malattie neurodegenerative, e nei tessuti cerebrali di canadesi malati di Alzheimer (concentrazione media di BMAA di 107 µg/g), ma non nel tessuto cerebrale di altri canadesi che sono morti per cause non collegate alla neurodegenerazione. Questi risultati sono stati confermati in uno studio di Pablo *et al.* (2009) che ha rilevato BMAA nel tessuto cerebrale di canadesi affetti da morbo di Parkinson (concentrazione media di 214 µg/g della BMAA), nel tessuto cerebrale di pazienti statunitensi affetti da SLA (concentrazione media della BMAA 268 µg/g), ma non in quello di pazienti con malattia di Huntington, o nei controlli: questo ha suggerito che la BMAA non si trova come un sottoprodotto della neurodegenerazione.

Studi successivi hanno poi mostrato che la BMAA si trova in 2 forme: come forma libera e come forma legata alle proteine di tessuti animali e vegetali. Negli ultimi 4 decenni c'è stata una

considerevole riduzione dell'incidenza e della prevalenza della SLA/PDC (fino ad un tasso di 7/100000) rispetto ai tassi di incidenza descritti nel resto del mondo, e la malattia sembra essersi evoluta nel tempo, presentandosi prevalentemente in modo clinico come parkinsonismo e demenza piuttosto che come SLA, indicando ancor più la probabile origine ambientale e non genetica.

Mentre la neurofarmacologia della BMAA è ben definita, il suo metabolismo è ancora poco conosciuto: sono stati proposti diversi meccanismi di tossicità ma non si conosce il ruolo preciso nella neurotossicità e nella neurodegenerazione. I meccanismi biochimici coinvolti nella neurotossicità sono molteplici ed è probabile che varino da specie a specie, ma i meccanismi con cui essa è espressa sono ancora poco compresi. Molti studi *in vitro* hanno ottenuto risultati che sostengono l'ipotesi del legame tra BMAA e SLA/PDC contribuendo alla perdita selettiva dei motoneuroni, mentre alcuni studi non sono riusciti a dimostrare la neurotossicità della BMAA in modelli di roditori.

Un'ipotesi fatta è che nella forma libera la BMAA potrebbe essere incorporata alle proteine e in seguito portare alla loro denaturazione, funzionando come un serbatoio tossico endogeno che rilascia lentamente la neurotossina in forma libera nelle cellule; essa quindi si accumulerebbe e sarebbe trasportata attraverso i livelli trofici, fino ad essere poi rilasciata durante il metabolismo delle proteine, causando così danni neurologici iniziali e persistenti per diversi anni. Questo potrebbe spiegare il lungo periodo di latenza osservato tra i Chamorro per l'insorgenza della malattia neurologica. Non si sa con quale meccanismo la BMAA verrebbe incorporata nelle proteine: essa potrebbe portare alla denaturazione delle proteine producendo forme anomale o tronche sostituendosi ad aminoacidi normali durante la sintesi proteica, o attraverso l'interferenza con il metabolismo o la funzione di ioni metallici e/o di neurorecettori. Quasi tutti gli studi *in vivo* con la BMAA hanno dimostrato la sua neurotossicità, che è particolarmente associata alla funzione motoria ed è supportata da studi *in vitro*. Tra questi solo gli studi di Spencer *et al.* (1987) furono in grado di riprodurre nelle scimmie una patologia molto simile alla SLA-PDC umana: infatti i cambiamenti osservati in risposta alla BMAA nei roditori e nei piccoli vertebrati (pulcini) non sono una riproduzione chiara della SLA-PDC umana, poiché bisogna considerare sia la diversa suscettibilità delle specie alle tossine sia le differenze funzionali nell'organizzazione delle strutture neuronali responsabili della funzione motoria tra l'uomo e gli altri mammiferi.

Studi condotti sui topi hanno dimostrato che l'esposizione alla BMAA durante il BGS mediante cibo o acqua contaminati potrebbe costituire un fattore di rischio umano molto importante, in quanto sono state rilevate conseguenze a lungo termine per lo svolgimento delle attività del comportamento adulto con deficit nell'apprendimento spaziale, a causa del trasferimento placentare della BMAA attraverso la BEE con elevato assorbimento da parte del cervello del feto murino al 14° giorno di gestazione e localizzazione in aree distinte del cervello.

Gli studi condotti su colture di cellule corticali hanno dimostrato che la BMAA è neurotossica sia *in vivo* che *in vitro*, ma sono necessarie concentrazioni molto elevate (1-3 mM) per indurre morte neuronale.

Esperimenti *in vitro* e *in vivo* hanno provato che la BMAA:

- attiva i recettori ionotropici (AMPA, kainato, NMDA) e i recettori metabotropici (mGluR) del glutammato inducendo la degenerazione neuronale attraverso un meccanismo eccitotossico;
- causa la perdita selettiva dei motoneuroni in colture miste dissociate di midollo spinale a concentrazioni di circa 30  $\mu$ M attraverso l'attivazione del recettore AMPA/kainato, potendo così scatenare la malattia dei motoneuroni in individui geneticamente vulnerabili;
- induce stress ossidativo;

- a basse concentrazioni può influenzare la crescita dei neuriti e i livelli dei neurofilamenti proteici nelle cellule in coltura;
- altera la funzione proteica attraverso l'incorporazione nelle proteine;
- induce una degenerazione neuronale mediante eccesso di attivazione dei recettori del glutammato.

Questi risultati sono stati confermati da Lobner *et al.* (2007) in colture di cellule corticali, indicando che è poco probabile che la BMAA da sola causi deficit neurologici (a meno che siano assunte concentrazioni molto elevate), ma a partire da concentrazioni di 10  $\mu\text{M}$ , soprattutto in individui predisposti geneticamente, può potenziare il danno neurale indotto da altri insulti, che potrebbe condurre allo sviluppo di malattie neurodegenerative aumentandone il danno, accelerandone l'insorgenza, o prolungandone gli effetti.

Quindi, nonostante il legame tra BMAA e malattie umane neurodegenerative, come la SLA/PDC, rimanga molto dibattuto, soprattutto a causa della mancanza di un modello animale accettato che possa dare una maggiore conferma ai risultati di analisi, ci sono molte prove che dimostrano la tossicità di questa neurotossina.

Poiché la BMAA è distribuita nei più differenti ambienti ed ecosistemi della Terra (in quanto prodotta da praticamente tutti i cianobatteri, che sono ubiquitari), rappresentando una possibile minaccia per la salute umana attraverso molte probabili fonti di esposizione, risulta essenziale condurre ulteriori studi per dimostrare con maggiore certezza l'effettivo ruolo di questa neurotossina nelle malattie neurodegenerative umane, e per chiarire le possibili fonti di esposizione umana e gli eventuali rischi connessi.

## BIBLIOGRAFIA

- Banack SA, Caller TA, Stommel EW. The Cyanobacteria Derived Toxin Beta-N-Methylamino-L-Alanine and Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Toxins* 2010a;2(12):2837-50.
- Banack SA, Downing TG, Spáčil Z, Purdie EL, Metcalf JS, Downing S, Esterhuizen M, Codd GA, Cox PA. Distinguishing the cyanobacterial neurotoxin  $\beta$ -N-methylamino-L-alanine (BMAA) from its structural isomer 2,4-diaminobutyric acid (2,4-DAB); *Toxicon* 2010b;56:868-79.
- Banack SA, Johnson HE, Cheng R, Cox PA. Production of the Neurotoxin BMAA by a Marine Cyanobacterium. *Mar Drugs* 2007;5:180-96.
- Brand LE, Pablo J, Compton A, Hammerschlag N, Mash DC. Cyanobacterial blooms and the occurrence of the neurotoxin, beta-N-methylamino-L-alanine (BMAA), in South Florida aquatic food webs. *Harmful Algae* 2010;9:620-35.
- Bruno M, Gallo P, Ferranti P, Messineo V, Melchiorre S. *Contaminazione da tossine algali in fauna ittica italiana: metodi di rilevazione e analisi*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2010. (Rapporti ISTISAN 10/23).
- Caller TA, Doolin JW, Haney JF, Murby AJ, West KG, Farrar HE, Ball A, Harris BT, Stommel EW . A cluster of amyotrophic lateral sclerosis in New Hampshire: a possible role for toxic cyanobacteria blooms. *Amyotroph Lateral Scler* 2009;10(2):101-8.
- Cox P. A., Sacks O W. Cycad neurotoxins, consumption of flying foxes, and ALSPDC disease in Guam. *Neurology* 2002;58:956-9.
- Cox PA, Banack PA, Murch SJ, Rasmussen U, Tien G, Bidigare RR, Metcalf JS, Morrison LF, Codd GA, Bergman B. Diverse taxa of cyanobacteria produce  $\beta$ -N-methylamino-L-alanine, a neurotoxic amino acid. *Proc Natl Acad Sci* 2005;102(14):5074-8.
- Cox PA, Banack S, Murch S, Sacks O. Scientific correspondence: Commentary on: return of the cycad hypothesis—does the amyotrophic lateral sclerosis/Parkinsonism dementia complex (ALS/PDC) of Guam have new implications for global health? *Neuropathology and Applied Neurobiology* 2006;32:679-82.
- Cox PA, Banack SA, Murch SJ. Biomagnification of cyanobacterial neurotoxins and neurodegenerative disease among the Chamorro people of Guam. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100(23):13380-3.
- Duncan MW, Steele JC, Kopin, IJ, Markey SP. 2-Amino-3-(methylamino)- propanoic acid (BMAA) in cycad flour: an unlikely cause of amyotrophic lateral sclerosis and parkinsonism-dementia of Guam. *Neurology* 1990;40:767-72.
- Duncan MW, Villacreses NE, Pearson PG, Wyatt L, Rapoport SI, Kopin IJ, Markey SP, Smith QR. 2-Amino-3-(methylamino)-propanoic acid (BMAA) pharmacokinetics and blood-brain barrier permeability in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 1991;258:27-35.
- Dörr FA, Rodriguez V, Molica R, Henriksen P, Krock B, Pinto E. Methods for detection of anatoxin-a(s) by liquid chromatography coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Toxicon* 2010;55:92-9.
- Esterhuizen M, Downing TG. Highlighted article:  $\beta$ -N-methylamino-L-alanine (BMAA) in novel South African cyanobacterial isolates. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 2008;71:309-13.
- Garruto RM, Gajdusek C, Chen KM. Amyotrophic lateral sclerosis among Chamorro migrants from Guam. *Ann Neurol*. 1980;8:612-9.
- Gubisne-Haberle D, Hill W, Kazachkov M, Richardson JS, Yu PH. Protein cross-linkage induced by formaldehyde derived from semicarbazide-sensitive amine oxidase mediated deamination of methylamine. *J Pharmacol Exp Ther* 2004;310:1125-32.

- Ince PG, Codd GA. Annotation: Return of the cycad hypothesis – does the amyotrophic lateral sclerosis/parkinsonism dementia complex (ALS/PDC) of Guam have new implications for global health? *Neuropathology and Applied Neurobiology* 2005;31:345-53.
- International Agency for Research on Cancer. *Ingested nitrate and nitrite, and cyanobacterial peptide toxins*. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Volume 94. Lyon: IARC; 2008.
- Johnson HJ, King SR, Banack SA, Webster C, Callanaupa WJ, Cox PA. Cyanobacteria (*Nostoc commune*) used as a dietary item in the Peruvian highlands produce the neurotoxic amino acid BMAA. *Journal of Ethnopharmacology* 2008;118:159-65.
- Jonasson S, Eriksson J, Berntzon L, Spáčil Z, Ilag LL, Ronnevi L-O, Rasmussen U, Bergman B. Transfer of a cyanobacterial neurotoxin within a temperate aquatic ecosystem suggests pathways for human exposure. *Proc Natl Acad Sci* 2010;107(20):9252-7.
- Karamyan VT, Speth RC. Animal models of BMAA neurotoxicity: A critical review. *Life Sciences* 2008;82:233-46.
- Karlsson O, Lindquist NG, Brittebo EB, Roman E. Selective Brain Uptake and Behavioral Effects of the Cyanobacterial Toxin BMAA ( $\beta$ -N-Methylamino-L-alanine) following Neonatal Administration to Rodents. *Toxicological Sciences* 2009a;109(2):286-95.
- Karlsson O, Roman E, Brillebo EB. Long-term Cognitive Impairments in Adult Rats Treated Neonatally with  $\beta$ -N-Methylamino-L-Alanine. *Toxicological Sciences* 2009b;112(1):185-95.
- Krüger T, Mönch B, Oppenhäuser S, Luckas B. LC-MS/MS determination of the isomeric neurotoxins BMAA ( $\beta$ -N-methylamino-L-alanine) and DAB (2,4-diaminobutyric acid) in cyanobacteria and seeds of *Cycas revoluta* and *Lathyrus latifolius* *Toxicon* 2010;55:547-57.
- Liu X, Rush T, Zapata J, Lobner D. beta-N-methylamino-l-alanine induces oxidative stress and glutamate release through action on system Xc(-). *Exp Neurol* 2009;217:429-33.
- Lobner D, Piana PMT, Salous AK, Peoples RW.  $\beta$ -N-methylamino-L-alanine enhances neurotoxicity through multiple mechanisms. *Neurobiology of Disease* 2007;25:360-6.
- Martin RB. Amino Acids and Derivatives as Ambidentate Ligands. In: Sigel H. (Ed.), *Metal Ions in Biological Systems*. New York: Dekker; 1978. p. 1-39.
- Mash D, Pablo J, Banack S, Cox PA, Johnson TE, Papapetropoulos S, Bradley W. Cyanobacterial toxin BMAA in neurodegeneration. *Amyotroph Lateral Scler* 2008;9 (Suppl. 1):89-90.
- Metcalf JS, Banack SA., Lindsay J, Morrison LF, Cox PA, Codd GA. Cooccurrence of  $\beta$ -N-methylamino-L-alanine, a neurotoxic amino acid with other cyanobacterial toxins in British waterbodies, 1990-2004. *Environmental Microbiology* 2008;10(3):702-8.
- Monson C, Banack S, Cox P. Conservation implications of Chamorro consumption of flying foxes as a possible cause of amyotrophic lateral sclerosis-parkinsonism dementia complex in Guam. *Conserv Biol* 2003;17:678-86.
- Montine TJ, Li K, Perl DP, Galasko D. Lack of beta-methylamino-L-alanine in brain from controls, AD, or Chamorros with PDC. *Neurology* 2005;65:768-9.
- Murch SJ, Cox PA, Banack SA. A mechanism for slow release of biomagnified cyanobacterial neurotoxins and neurodegenerative disease in Guam. *Proc Natl Acad Sc I USA* 2004a;101:12228-31.
- Murch SJ, Cox PA, Banack SA, Steele JC, Sacks OW. Occurrence of betamethylamino-L-alanine (BMAA) in ALS/PDC patients from Guam. *Acta Neurol Scand* 2004b;110:267-9.
- Nunn PB, Ponnusamy M.  $\beta$ -N-Methylaminoalanine (BMAA): Metabolism and metabolic effects in model systems and in neural and other tissues of the rat in vitro. *Toxicon* 2009;54:85-94.

- Pablo JS, Banack SA, Cox PA, Johnson TE, Papapetropoulos S, Bradley S, Buck A, Mash DC. Cyanobacterial neurotoxin BMAA in ALS and Alzheimer's disease. *Acta Neurol Scand* 2009;120(4):216-25.
- Papapetropoulos S. Is there a role for naturally occurring cyanobacterial toxins in neurodegeneration? The beta-N-methylamino-L-alanine (BMAA) paradigm. *Neurochemistry International* 2007;50:998-1003.
- Rao SD, Banack SA, Cox PA, Weiss JH. BMAA selectively injures motor neurones via AMPA/kainate receptor activation. *Exp Neurol* 2006;201:244-52.
- Ross SM, Seelig M, Spencer RS. Specific antagonism of excitotoxic action of 'uncommon' amino acids assayed in organotypic mouse cortical cultures. *Brain Res* 1987;425:120-7.
- Shaw GR, Seawright AA, Moore MA, Lam PKS. Cyindrospermopsin, a cyanobacterial alkaloid: evaluation of its toxicological activity. *Ther Drug Monit* 2000;22:89-92.
- Shen XY, Lam PKS, Shaw GR, Wickramasinghe W. Genotoxicity investigation of a cyanobacterial Toxin, cyindrospermopsin. *Toxicon* 2002;40:1499-501.
- Spencer PS, Nunn PB, Hugon J, Ludolph AC, Ross SM, Roy DN, Robertson RC. Guam amyotrophic lateral sclerosis-parkinsonism dementia linked to a plant excitant neurotoxin. *Science* 1987;237:517-22.
- Vega A, Bell EA.  $\alpha$ -amino- $\beta$ -methylaminopropionic acid, a new amino acid from seeds of *Cycas circinalis*. *Phytochemistry* 1967;6:759-62.
- Weiss JH, Koh JY, Choi, DW. Neurotoxicity of beta-N-methylamino-L- alanine (BMAA) and beta-N-oxalylamino-L-alanine (BOAA) on cultured cortical neurons. *Brain Res* 1989;497:64-71.

*Stampato da Tipografia Facciotti srl  
Vicolo Pian Due Torri 74, 00146 Roma*

*Roma, aprile-giugno 2012 (n. 2) 4° Suppl.*